

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) POR *RALSTONIA*
EUTROPHA EM SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO: ESTUDO DE
DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE LIMITAÇÃO DO CRESCIMENTO**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

RAFAEL DE OLIVEIRA PINTO

FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 1999

**PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) POR *RALSTONIA*
EUTROPHA EM SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO: ESTUDO DE DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE LIMITAÇÃO DO CRESCIMENTO**

Por

Rafael de Oliveira Pinto

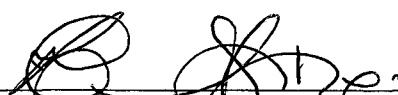
Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.
Área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**
e aprovada em sua forma final pelo curso de Pós-Graduação



Prof.^a. Dr.^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora

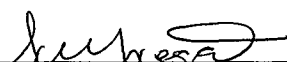


Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Co-Orientador

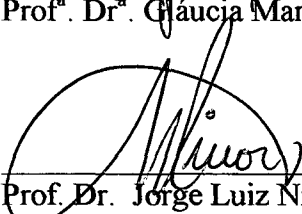


Prof. Dr. Humberto Jorge José
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão



Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior



Prof.^a. Dr.^a. Regina Vasconcellos Antônio

Florianópolis, 04 de outubro de 1999

A ciência será sempre uma
busca, jamais um descobrimento
real. É uma viagem, nunca uma
chegada.

Karl Popper
1902-
filósofo austríaco

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar meus mais sinceros agradecimentos:

À minha orientadora professora Gláucia Aragão pelo incentivo, confiança e principalmente por tudo que aprendi sobre dedicação.

Ao professor Agenor Furigo pela co-orientação e por sua grande contribuição durante a elaboração da dissertação.

À bolsista Daniela Becker, que me acompanhou desde o início dos trabalhos e com quem sempre pude contar para uma perfeita execução dos experimentos no laboratório.

Aos técnicos Denise Moritz e João Correia pelos conselhos e experiências transmitidas.

Aos professores dos cursos de Pós-graduação de Engenharia Química e de Biotecnologia pelos conhecimentos adquiridos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro à ciência no Brasil.

A todos os colegas que comigo cursaram os créditos da pós-graduação em especial à colega Roberta Miranda Teixeira que também conviveu comigo no Laboratório de Engenharia Bioquímica.

A todos os meus amigos, em especial aqueles que contribuíram, de alguma forma, para o desenvolvimento de meu trabalho, entre eles, Rodrigo Ninow, Cíntia Marangoni e Joanir Kalnin.

Aos meus pais, José Luiz e Deise de Oliveira Pinto, e aos meus irmãos Rodrigo e Raquel pelo amor, carinho, amizade e por tudo que representam em minha vida.

E agradeço sobretudo a Deus pelo destino que me ofereceu.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
1.1- DESCRIÇÃO E PROPRIEDADES DOS POLIHIDROXIALCANOATOS.....	03
1.2- MICRORGANISMOS PRODUTORES.....	06
1.3- DESCRIÇÃO GERAL DA <i>R. eutropha</i>	10
1.4- BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO PHA.....	13
1.4.1- BIOSÍNTESE DE PHA.....	14
1.4.1.1-Síntese de <i>P(3HB)</i>	14
1.4.1.1.1- 3- β -cetotiolase.....	14
1.4.1.1.2- Acetoacetil CoA redutase.....	15
1.4.1.1.3- PHA-sintetase.....	16
1.4.1.2-Recuperação das coenzimas.....	16
1.4.2- DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE PHA.....	17
1.4.3- REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE PHA.....	18
1.5- PRODUÇÃO DE PHA.....	21
1.5.1- CULTURAS EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO.....	21
1.5.2- INFLUÊNCIA DE UMA LIMITAÇÃO OU DE UMA CARÊNCIA SOBRE A PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS.....	22
1.5.3- UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO.....	23
1.5.4- CONTROLE DE pH.....	25
1.6- RECUPERAÇÃO DO PHA INTRACELULAR.....	26
1.7- APLICAÇÕES DO PHA.....	27
1.8- BIODEGRADABILIDADE.....	28
1.9- FATORES QUE INFLUENCIAM O CUSTO DE PRODUÇÃO DE PHA.....	29

1.9.1- PRODUTIVIDADE DE PHA.....	30
1.9.2- CONTEÚDO DE PHA EM CÉLULAS.....	31
1.9.3- CUSTO DA FONTE DE CARBONO.....	32
1.9.4- INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO.....	33
1.9.5- MÉTODO DE RECUPERAÇÃO.....	34
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1- LINHAGEM BACTERIANA E MEIOS DE CULTURA.....	35
2.2- CONDIÇÕES DE CULTURA.....	36
2.2.1- PRÉ-CULTURAS.....	36
2.2.2- CULTURAS EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	36
2.2.3- CULTURAS EM FERMENTADOR.....	37
2.3- TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	37
2.3.1- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.....	37
2.3.1.1- Medida por espectrometria.....	37
2.3.1.2- Gravimetria.....	38
2.3.2- DOSAGEM DE SUBSTRATOS.....	38
2.3.2.1- Glicose e açúcar invertido.....	38
2.3.2.2- Proteínas.....	39
2.3.2.3- Dosagem de P(3HB).....	39
2.3.2.4- Dosagem de fosfato.....	40
2.3.2.5- Dosagem de nitrogênio.....	41
2.4- ANÁLISE CINÉTICA.....	42
2.5- TRATAMENTO DE DADOS.....	43
2.5.1- AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	43
2.5.2- VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO.....	43
2.5.3- FATORES DE CONVERSÃO.....	43
2.5.4- PRODUTIVIDADE MÉDIA DE P(3HB).....	44
2.5.5- PRODUTIVIDADE DE P(3HB) NA FASE DE PRODUÇÃO.....	44
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.1- ESTUDOS PRELIMINARES.....	45

3.1.1- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO EM GLICOSE E EM AÇÚCAR INVERTIDO.....	45
3.1.2- CRESCIMENTO DE <i>R. eutropha</i> EM ÁCIDO LÁTICO E SUBSTRATOS MISTOS.....	49
3.1.3- ESTUDO PRELIMINAR COM AÇÚCAR INVERTIDO COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE P(3HB) EM BIORREATOR.....	54
3.2- CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE P(3HB) EM AÇÚCAR INVERTIDO: NITROGÊNIO OU FÓSFORO COMO NUTRIENTES LIMITANTES.....	56
3.2.1- PRODUÇÃO DE P(3HB) SOB CARÊNCIA E LIMITAÇÃO EM NITROGÊNIO.....	57
3.2.1.1- <i>Características gerais das fases de crescimento e de produção</i>	58
3.2.1.2- <i>Conclusão</i>	65
3.2.2- PRODUÇÃO DE P(3HB) SOB CARÊNCIA E LIMITAÇÃO EM FÓSFORO.....	66
3.2.2.1- <i>Características gerais das fases de crescimento e de produção</i>	66
3.2.2.2- <i>Conclusão</i>	74
 CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	 75
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 80
 ANEXOS.....	 97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Estrutura geral dos polihidroxicanoatos para diferentes monômeros.....	04
Figura 1.2- Metabolismo central da <i>R. eutropha</i> : ciclo de Krebs e enzimas em torno do piruvato e do acetato.....	12
Figura 1.3- Síntese e degradação de P(3HB).....	14
Figura 1.4- Biossíntese e degradação de P(3HB).....	20
Figura 3.1- Evolução da concentração de biomassa total para a cultura em açúcar invertido e em glicose.....	46
Figura 3.2- Evolução do pH e curva do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm para a cultura em glicose.....	47
Figura 3.3- Evolução do pH e curva do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm para a cultura em açúcar invertido.....	48
Figura 3.4- Evolução do pH e curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm e da proteína para a cultura em ácido láctico.....	50
Figura 3.5- Evolução do pH e curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm e da proteína para a cultura em açúcar invertido + ácido láctico.....	50
Figura 3.6- Evolução do pH e curva do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm para a cultura em glicose + ácido láctico.....	51
Figura 3.7- Evolução do pH e do consumo de açúcar invertido ao longo do tempo para a cultura mista açúcar invertido + ácido láctico.....	52
Figura 3.8- Evolução do pH e do consumo de glicose ao longo do tempo para a cultura mista glicose + ácido láctico.....	53
Figura 3.9- Evolução das concentrações de biomassa total, P(3HB), proteína e açúcar invertido em função do tempo.....	55
Figura 3.10- Evolução das quantidades de biomassa total, P(3HB), biomassa residual, proteína, açúcar invertido, nitrogênio e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) em função do tempo para a cultura sob carência em nitrogênio.....	59

Figura 3.11- Evolução das quantidades de biomassa total, P(3HB), biomassa residual, proteína, açúcar invertido, nitrogênio e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) em função do tempo para a cultura sob limitação em nitrogênio.....	60
Figura 3.12- Evolução das produtividades médias, expressas em $\text{gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para as culturas sob carência e limitada em nitrogênio.....	62
Figura 3.13- Curva do logaritmo neperiano da biomassa residual para a cultura sob carência em nitrogênio.....	63
Figura 3.14- Evolução das velocidades específicas de produção de P(3HB) com relação ao tempo para as culturas sob carência e limitação em nitrogênio.....	64
Figura 3.15- Evolução do pH ao longo do tempo para as culturas em carência e limitação em nitrogênio.....	65
Figura 3.16- Evolução das quantidades de biomassa total, P(3HB), biomassa residual, proteína, açúcar invertido, fosfato e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) em função do tempo para a cultura sob carência em fósforo.....	67
Figura 3.17- Quantidade residual de fosfato no meio e curva do logaritmo neperiano da biomassa residual para a cultura sob carência em fósforo.....	68
Figura 3.18- Evolução das quantidades de biomassa total, P(3HB), biomassa residual, proteína, açúcar invertido, fosfato e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) em função do tempo para a cultura sob limitação em fósforo.....	69
Figura 3.19- Evolução das produtividades médias, expressas em $\text{gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para as culturas sob carência e limitada em fósforo.....	70
Figura 3.20- Evolução da produtividade em P(3HB) na fase de produção, expressas em $\text{gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para as culturas sob carência em nitrogênio, limitação em nitrogênio, carência em fósforo e limitação em fósforo.....	71
Figura 3.21- Curva do logaritmo neperiano da biomassa residual para a cultura sob carência e limitação em fósforo.....	72

Figura 3.22- Evolução das velocidades específicas de produção de P(3HB) com relação ao tempo para as culturas sob carência e limitação em fósforo.....73

Figura 3.23- Evolução do pH ao longo do tempo para as culturas sob carência e limitação em fósforo.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Estimativa do custo operacional de produção de 100000 toneladas/ano de P(3HB) com <i>A. latus</i> , <i>M. organophilum</i> e <i>E. coli</i> recombinante como microrganismos produtores.....	31
Tabela 1.2- Efeito do custo do substrato e do fator de conversão em P(3HB) sobre o custo de produção de P(3HB).....	33
Tabela 2.1- Composição do meio MM.....	35
Tabela 2.2- Composição da solução concentrada de oligo-elementos.....	36
Tabela 2.3- Sequência para a dosagem de fosfato.....	41
Tabela 2.4- Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.....	42
Tabela 3.1- Velocidades específicas de crescimento celular e de formação de proteína para as culturas em glicose e em açúcar invertido.....	48
Tabela 3.2- Velocidades específicas de crescimento celular para as culturas em ácido láctico sozinho e combinado com glicose ou açúcar invertido.....	52
Tabela 3.3- Fatores de conversão de açúcar invertido em biomassa total, biomassa residual e P(3HB) nas fases de crescimento e produção para as culturas A e B.....	61

NOMENCLATURA

μ	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
μ_{prot}	velocidade específica máxima de crescimento celular representada pela proteína ($\text{g}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{prot}}.\text{h}$)
abs	absorbância
DSM	<i>Deutsche Sammlung vor Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
$[\text{NH}_4^+]$	concentração de nitrogênio amoniacal (g.L^{-1})
P(3HB)	poli-3-hidroxibutirato
P_r	produtividade média de P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
P_p	produtividade na fase de produção ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
q_{PHB}	velocidade específica de produção de P(3HB) ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Q	componente que pode ser biomassa, biomassa residual ou P(3HB) (g)
rpm	rotações por minuto
S	substrato utilizado (g)
t	tempo (h)
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
X_r	biomassa residual (g)
X_{r0}	biomassa residual inicial (g)
X_t	biomassa total (g)
$Y_{Q/S}$	fator de conversão de substrato S em componente Q (g.g^{-1})
$Y_{Xt/S}$	fator de conversão de açúcar invertido em biomassa total (g.g^{-1})
$Y_{Xr/S}$	fator de conversão de açúcar invertido em biomassa residual (g.g^{-1})
$Y_{\text{P(3HB)}/S}$	fator de conversão de açúcar invertido em P(3HB) (g.g^{-1})

RESUMO

Poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) é um éster polimérico biodegradável que apresenta propriedades termoplásticas semelhantes às do polipropileno. Este biopolímero é uma substância de reserva de carbono e energia que se acumula no interior das células de diversos microrganismos, em condições de crescimento desbalanceado. O processo de produção de P(3HB) é normalmente conduzido em duas fases: uma fase de crescimento não limitado para acúmulo de biomassa, em um meio de cultura balanceado, e uma fase de limitação ou exaustão de um ou mais elementos essenciais, com o fornecimento de excesso de fonte de carbono, para favorecer o acúmulo intracelular do polímero. O microrganismo mais utilizado para a produção industrial de P(3HB) é a *Ralstonia eutropha*. O objetivo principal do presente trabalho é estudar a viabilidade da utilização do açúcar invertido como substrato de baixo custo para a produção de P(3HB), por *R. eutropha* (DSM 545), sob carência ou limitação em nitrogênio ou fósforo durante a fase de crescimento limitado. Estudos preliminares em frascos agitados mostraram que a *R. eutropha* é capaz de se desenvolver em açúcar invertido com velocidade específica de crescimento (μ) de $0,20\text{ h}^{-1}$ próxima à obtida em glicose ($0,19\text{ h}^{-1}$). Foi observado ainda que, para se evitar a inibição ou limitação do açúcar invertido no meio, deve-se trabalhar, preferencialmente, em uma faixa de concentração entre 10 e 40 g.L^{-1} de açúcar invertido. O crescimento de *R. eutropha* também foi estudado em ácido láctico e em misturas deste ácido com glicose e açúcar invertido. Foram realizados experimentos batelada alimentada em biorreator para estudar a influência de diferentes estratégias de alimentação do elemento limitante sobre a produção de P(3HB). Observou-se que, nas culturas onde uma atividade celular mínima foi mantida durante a fase de produção (casos da limitação em nitrogênio, carência em fósforo ou limitação em fósforo), a produtividade em P(3HB) é mais elevada do que no caso onde a carência do elemento limitante provoca uma interrupção da atividade de síntese protéica (caso da carência em nitrogênio). Os resultados de produtividade média de P(3HB) para as culturas sob carência e limitação em nitrogênio foram, respectivamente, de $0,16$ e $0,23\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que para as culturas sob carência e limitação em fósforo foram obtidas produtividades de $0,34\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,24\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

ABSTRACT

Poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) is a biodegradable polymeric ester that presents similar thermoplastic properties to the polypropylene ones. This biopolymer is a carbon and energy storage substance that is built up inside the cells of several microorganisms on not balanced growth conditions. The process of P(3HB) production normally is carried out in two stages: a not limited growth phase for biomass accumulation, carried on a balanced culture broth, and a phase of limitation or exhaustion of one or more essential elements, with excess of the carbon source, to induce intracellular polymer accumulation. The most used microorganism for the industrial production of P(3HB) is *Ralstonia eutropha*. The aim of the present work is to study the viability of the use of the inverted sugar as a low cost carbon source for the P(3HB) production, using *R. eutropha* (DSM 545) under nitrogen or phosphorus lack or limitation during the limited growth phase. Preliminary studies on agitated Erlenmeyers have shown that *R. eutropha* is able to grow in inverted sugar with a specific growth rate of 0.20 h^{-1} similarly to the rate obtained in glucose (0.19 h^{-1}). It was still observed that to prevent the inhibition or limitation on the cell growth, it is recommended to work in a concentration range between 10 and 40 g.L^{-1} of inverted sugar. The growth of *R. eutropha* was also studied on lactic acid and on a mixture of this acid with glucose and with inverted sugar. Fed batch experiments were carried out on a bioreactor in order to study the influence of different feed strategies of the limiting element on the P(3HB) production. It was observed that cultures, where a minimum cellular activity was maintained during the production phase (nitrogen limitation, phosphate lack or phosphate limitation cases), the P(3HB) productivity is greater than in that case where the nutrient lack promotes an interruption of the protein synthesis activity (nitrogen lack case). The results of the P(3HB) average productivity for the cultures under nitrogen lack and nitrogen limitation were, respectively, 0.16 and $0.23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, while the productivity for the cultures under phosphorus lack and phosphorus limitation were 0.34 and $0.24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectively.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Polihidroxicanoatos (PHAs) constituem uma classe geral de polímeros microbianos (ésteres poliméricos) (Doi, 1990). Em bactérias, são produzidos e acumulados, como reserva de carbono e energia, em grânulos localizados no interior das células, os quais podem representar até 80% da massa seca total da célula (Dawes e Senior, 1973). O acúmulo de PHA se dá em condições de crescimento não balanceadas, onde há excesso de fonte de carbono e limitação em um elemento essencial à multiplicação celular (fósforo, nitrogênio, enxofre, magnésio, etc.) (Dawes e Senior, 1973).

Estes polímeros têm despertado grande interesse industrial e ambiental por serem termoplásticos ou elastômeros termoplásticos biodegradáveis (Gomez e Bueno Netto, 1997). Sua utilização permite a fabricação de embalagens e materiais descartáveis não agressivos ao meio ambiente sendo, dessa forma, excelentes candidatos para substituir os plásticos derivados do petróleo. Entre os PHAs mais estudados encontra-se o poli-3-hidroxicaproatato (P(3HB)), homopolímero que apresenta propriedades termoplásticas próximas às do polipropileno.

O processo de produção de P(3HB) é normalmente conduzido em duas fases: uma fase de crescimento não limitado para acúmulo de biomassa em um meio de cultura balanceado e, na sequência, uma fase de limitação ou exaustão de um ou mais elementos nutritivos associado ao fornecimento de excesso de fonte de carbono, para favorecer o acúmulo intracelular do polímero (Doi, 1990). As culturas para produção deste biopolímero são realizadas em processos de batelada alimentada (também conhecidos como reatores "fed-batch"), tendo este sido escolhido devido à alta concentração celular desejada para o processo industrial. Apesar do P(3HB) ser produzido em nível industrial (Byrom, 1987), o seu custo de produção é ainda muito elevado quando comparado com os plásticos de origem petroquímica. Uma forma de reduzir os custos de fabricação está no processo para extração do polímero, na escolha do microrganismo produtor e no tipo de substrato utilizado.

Entre os microrganismos capazes de produzir P(3HB), a espécie *Ralstonia eutropha* é uma das que apresentam as condições mais favoráveis para a produção industrial. Este microrganismo pode acumular mais de 80% de sua massa celular em

P(3HB), com alto peso molecular e utilizando diferentes tipos de substratos como a glicose, frutose, ácido láctico, entre outros (Ramsay, 1994a).

O objetivo principal deste trabalho é o de analisar a viabilidade de se desenvolver culturas para a produção de P(3HB) por *R. eutropha* (DSM 545) usando açúcar invertido como substrato de baixo custo. O açúcar invertido, que se constitui na sacarose hidrolisada a glicose e frutose, é obtido como subproduto do processamento da cana-de-açúcar. A principal vantagem da utilização deste substrato estaria na sua grande disponibilidade no Brasil, o que poderia causar uma diminuição dos custos de produção do biopolímero. O outro objetivo deste trabalho é estudar a influência de diferentes estratégias de alimentação de um elemento essencial sobre o acúmulo de P(3HB), onde serão realizados estudos sob carência/limitação em nitrogênio ou fósforo.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1- DESCRIÇÃO E PROPRIEDADES DOS POLIHIDROXIALCANOATOS

Os polihidroxicanoatos constituem uma classe geral de polímeros (ésteres poliméricos) microbianos onde o mais estudado é o poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) (Doi, 1990). O P(3HB), bem como os outros PHAs, é uma substância de reserva de carbono e de energia que é acumulado no interior das células na forma de grânulos por uma grande variedade de microrganismos, em condições particulares de crescimento (Dawes e Senior, 1973). Os microrganismos capazes de acumular P(3HB) são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Byrom, 1987), que podem ser encontradas na natureza, isto é, no solo, água do mar, efluentes, etc. Estudos com vários organismos têm mostrado que os grânulos típicos de P(3HB) têm um diâmetro de 0,2 a 0,7 μm e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios cuja espessura é de 2 nm (Boatman, 1964; Lundgren et al., 1964; Wang e Lundgren, 1969; Nuti et al., 1972; Dunlop e Robards, 1973). O P(3HB) é um homopolímero alifático, poliéster, com repetidas unidades de ácido 3-hidroxibutírico.

O P(3HB) foi o primeiro composto desta categoria de material a ser descrito. Na década de 20, Lemoigne, um microbiologista do Instituto Pasteur, em Paris, isolou de *Bacillus megaterium* um polímero que demonstrou tratar-se de um poliéster do ácido 3-hidroxibutírico (Doi, 1990). Macrae e Wilkinson (citado por Braunegg et al., 1998), em 1958, observaram que *B. megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão glicose/nitrogênio no meio era elevada e a degradação deste ocorria rapidamente na ausência de fontes externas de carbono e energia. Eles concluíram desta forma que o P(3HB) era uma fonte reserva de carbono e energia.

A descoberta de outros monômeros diferentes do ácido 3-hidroxibutírico foi feita por Wallen e Rohwedder (1974) ao isolar estes poliésteres de lodo ativado. Os polihidroxicanoatos são compostos principalmente de 3-hidroxiácidos, mas unidades monoméricas compostas de 4-hidroxibutirato e 5-hidroxivalerato já foram observadas (Doi et al., 1988). Em 1983, foi relatado por De Smet et al. que *Pseudomonas*

oleovorans produz um polímero contendo ácido 3-hidroxiocetânico (3HO) como principal monômero quando n-octano era fornecido ao meio de cultura. Posteriormente, verificou-se que esta bactéria era capaz de incorporar monômeros com cadeias carbônicas de comprimento médio (de 6 a 12 carbonos na cadeia principal), quando suprida no meio de cultura com n-alcanos, n-alcóois ou ácidos carboxílicos com cadeias carbônicas do mesmo comprimento do principal monômero inserido (Huisman et al., 1989; Tim e Steinbüchel, 1990).

Os PHAs podem ser classificados em dois grupos: o primeiro é formado por polímeros constituídos por unidades monoméricas de 5 carbonos ou menos e são denominados de cadeia lateral curta (*short-side-chain*: SSC) e o segundo é formado de polímeros com unidades monoméricas contendo mais que 6 carbonos, denominado PHA de cadeia lateral média ou cadeia lateral longa (*long-side-chain*: LSC) (Ramsay, 1994a). A fórmula geral do PHA é a seguinte (Lee, 1996a):

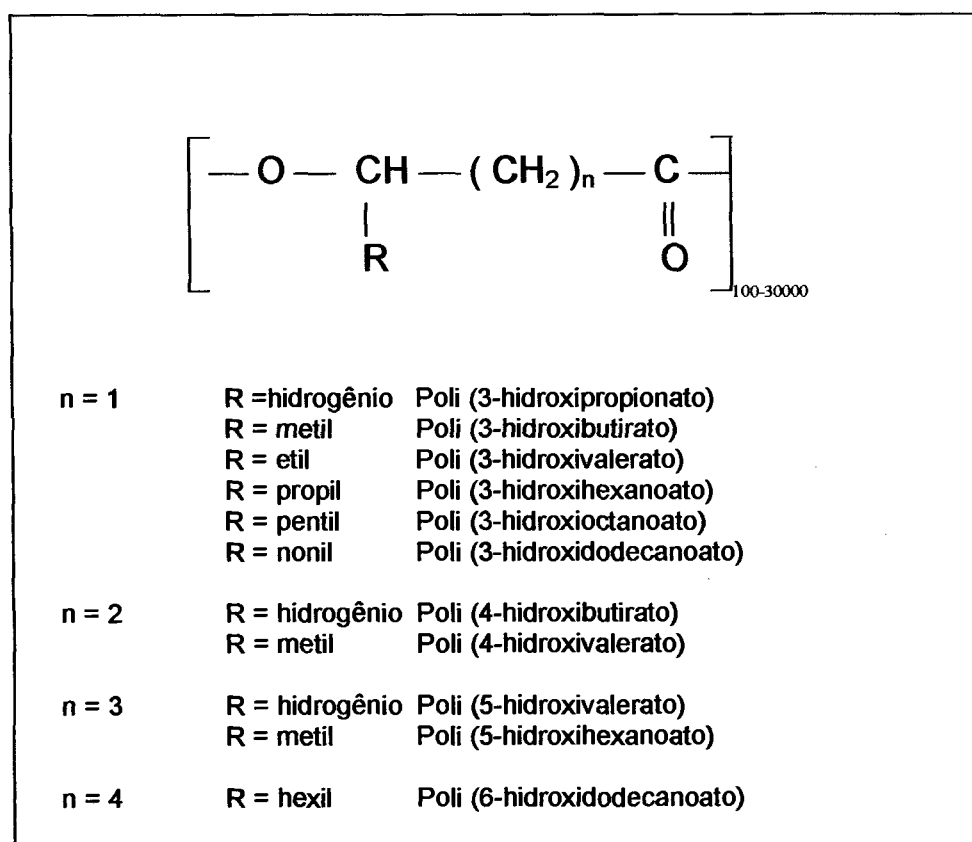


Figura 1.1- Estrutura geral dos polihidroxiacetatos para diferentes monômeros (Lee, 1996a).

As características mais importantes dos PHAs são a sua rápida biodegradabilidade e suas propriedades termoplásticas (Doi, 1990). Estes polímeros podem ser extraídos das células sob a forma de um pó inodoro, podendo sofrer as mesmas transformações que o polipropileno e apresentando propriedades próximas daquelas do polímero de origem petroquímica. As propriedades termoplásticas do P(3HB) são interessantes, contudo, o copolímero composto de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (poli(3HB-co-3HV)) apresenta propriedades mais interessantes do ponto de vista comercial (Byrom, 1987). Tais propriedades são função da composição em 3HV nas moléculas (Holmes, 1985; Doi, 1990).

As propriedades desejáveis às diferentes aplicações de um material plástico são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao impacto. O ponto de fusão do P(3HB) é próximo da temperatura que inicia sua degradação em ácido crotônico (aproximadamente 185°C), tornando difícil os processos de moldagem por injeção ou por sopro (Poirier et al., 1995). O P(3HB) tem uma resistência aos raios UV superior àquela que possui o polipropileno. Os filmes para embalagem fabricados com P(3HB) apresentam uma excelente impermeabilidade ao oxigênio (Holmes, 1985).

O P(3HB) é um material um tanto rígido e quebradiço, o que pode limitar sua aplicação, porém a incorporação de unidades de 3HV ao P(3HB) diminui os níveis de cristalinidade e o ponto de fusão do polímero. Isto acarreta uma diminuição da rigidez assim como um aumento da resistência ao impacto. Uma porcentagem de 3HV de 17% a 20% permite a obtenção de um copolímero com propriedades mais desejáveis, em particular a melhora de sua flexibilidade e resistência ao impacto (Holmes, 1985).

A capacidade de alongamento até a ruptura aumenta com a incorporação de 3HV ao copolímero. Os copolímeros de poli-3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxioctanoato (P(3HHx-co-3HO)) são elastômeros semicristalinos com baixo ponto de fusão, baixa resistência à pressão e uma elevada capacidade de alongamento até o ponto de ruptura (Lee, 1996a). Copolímeros de 3HB e 4HB também apresentam baixa cristalinidade, resultando em propriedades mecânicas próximas daquelas dos elastômeros quando o conteúdo de 4HB excede 40 mol% (Braunegg et al., 1998). De maneira similar, a cristalinidade do copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxipropionato (P(3HB-co-3HP)) decresce com o aumento da fração das unidades de 3HP (Nakamura et al., 1991). O P(3HB) e seus copolímeros têm suas conformações

delineadas principalmente pelas forças de Van der Waals existentes entre o oxigênio do grupo carbonil e o grupo metil (Braunegg et al., 1998).

O P(3HB) apresenta ainda as propriedades de ser opticamente ativo (cada monômero possui um carbono quiral em configuração D(-)), é piezoelétrico (as moléculas do polímero são organizadas em hélices sem centros simétricos), atóxico, insolúvel em água, alto grau de polimerização e é biocompatível (o que permite seu uso na área médica e farmacêutica) (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

1.2- MICRORGANISMOS PRODUTORES

A seleção do microrganismo e do substrato têm grande influência no custo de fabricação do PHA (Anderson e Dawes, 1990). É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevados, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA em relação a massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA bastante elevado (Ramsay, 1994a). O elevado custo de produção de PHA se deve, em grande parte, ao processo de extração do polímero. Para que este seja rentável, é necessário que a cepa produtora seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero. Este critério elimina da seleção todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não são capazes de acumular porcentagens elevadas de polímero (Ramsay et al., 1990a).

Gomez e Bueno Netto (1997) observaram nas bactérias produtoras de PHA dois comportamentos distintos. O primeiro comportamento é com relação ao comprimento da cadeia carbônica do monômero inserido. Assim, *R. eutropha* e *Rhodococcus* sp. são capazes de inserir em seus polímeros monômeros de cadeia curta (3 a 5 e mais raramente 6 carbonos). Por outro lado, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas oleovorans* são capazes de inserir monômeros com cadeia carbônica de comprimento médio (6 a 12 e mais raramente 5 carbonos). O outro comportamento diz respeito à capacidade ou não de sintetizar polímeros contendo monômeros diferentes de 3HB, sem a necessidade de serem supridas com um precursor. Deste modo, *Rhodococcus* sp. e *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar monômeros diferentes de 3HB e inserí-los em seus polímeros, a partir de substratos que não estão relacionados

estruturalmente ao monômero inserido. Por outro lado, *R. eutropha* e *P. oleovorans* só são capazes de incorporar monômeros diferentes de 3HB, se supridas com um substrato relacionado estruturalmente ao monômero que se deseja inserir, isto é, um precursor. No caso da *P. oleovorans*, por exemplo, foi observado que este microrganismo acumula ácido 3-hidroxiocetanóico como principal monômero quando n-octano é fornecido no meio de cultura (De Smet et al., 1983).

As bactérias que apresentam as características mais favoráveis para uma produção industrial são *Azotobacter* sp., *Methylobacterium* sp. e *Ralstonia eutropha* (Byrom, 1987), essencialmente em razão da variedade de substratos que eles podem utilizar. Além disso, as bactérias como *Alcaligenes latus* e bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam também propriedades favoráveis para a produção de biopolímeros. Não se pode esquecer, igualmente, da possibilidade da utilização de genes recombinantes em *Escherichia coli* ou em plantas transgênicas para a produção de PHA (Byrom, 1992).

Azotobacter sp. foi a primeira bactéria escolhida para a síntese industrial de P(3HB) por ser capaz de utilizar sacarose e glicose como substrato. Entretanto, ela foi rejeitada por produzir, paralelamente ao P(3HB), um polissacarídeo, tornando o processo de difícil controle (Byrom, 1987). Para tentar melhores condições de produção, Page e Knosp (1989) estudaram uma cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* capaz de acumular quantidades de P(3HB) superiores a 75% de sua massa seca, com um fator de conversão glicose em polímero de 0,33 g.g⁻¹. Depois de estabelecer que o valerato era o melhor precursor de 3HV, Page et al.(1992) usaram este sal em combinação com melaço de beterraba para produzir P(3HB-co-3HV) a partir da cepa mutante de *A. vinelandii*. O melhor resultado obtido foi um acúmulo, em sua massa seca, de 71% de copolímero contendo 23 mol% de 3HV. A produtividade máxima de PHA alcançada foi de 1,1 g.L⁻¹.h⁻¹. Os autores concluíram que a capacidade desta cepa de utilizar melaço de beterraba como fonte de carbono reduziria à metade o custo de produção de PHAs formados a partir da glicose. Contudo, é preciso ver que a produtividade obtida ainda é inferior se comparado com o que se consegue usando *Ralstonia eutropha* (3,14 g.L⁻¹.h⁻¹, Ryu et al., 1997).

Um outro campo de estudo é a utilização de microrganismos metilotróficos tendo o metanol como fonte de carbono. Bourque et al.(1992) usaram *Methylobacterium extorquens* para produzir P(3HB) a partir de metanol e P(3HB-co-3HV) a partir de

metanol e valerato. Os autores consideraram o metanol um substrato interessante já que este é relativamente barato, de fácil manuseio, completamente solúvel em água e de baixa viscosidade. Entretanto, de acordo com Byrom (1992), o processo de produção é lento, gera uma baixa quantidade de polímero, tem baixo peso molecular e a extração é difícil.

Alcaligenes latus, outro microrganismo de interesse industrial para a produção de PHA, é capaz de utilizar diferentes substratos com uma velocidade específica de crescimento elevada e com uma produção de biopolímero associada ao seu crescimento. Trabalhando em condições não limitantes, Yamane et al. (1996) obtiveram menos de 50% de PHA na biomassa seca com um fator de conversão de substrato em polímero de 0,17 gP(3HB)/gsacarose. Ao contrário, trabalhando sob limitação de nitrogênio, Wang e Lee (1997a) conseguiram um conteúdo de P(3HB) em biomassa seca de 88% com um fator de conversão de 0,42 gP(3HB)/gsacarose. Portanto, apesar de *A. latus* ser classificado como um produtor de PHA associado ao seu crescimento, esta cepa pode acumular muito mais PHA sob condições de limitação (Choi e Lee, 1999a). O *A. latus* tem como desvantagem a sua sensibilidade aos precursores utilizados para a produção de poli(3HB-co-3HV) (Ramsay et al., 1990a), em particular, o crescimento desta cepa é completamente inibida em presença de 0,5 g.L⁻¹ de ácido propiônico (Braunegg et al., 1995).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem produzir tanto polihidroxialcanoatos de cadeia lateral média (MSC) quanto de cadeia lateral longa (LSC) (De Smet et al., 1983; Preusting et al., 1991). Esta produção é obtida a partir de substratos de cadeia de carbono alifática longa como os alcanos e os ácidos alcanóicos. Bear et al.(1997), citado por Braunegg et al.(1998), foram capazes de produzir um copolíester contendo acima de 37% de grupos epóxi nas cadeias laterais quando *P. oleovorans* era alimentado com uma mistura de 10-epoxiundecanóico e octanoato de sódio. Devido ao fato de ser imiscível em meio aquoso, inúmeras dificuldades surgem na preparação das culturas destes microrganismos para a produção de LSC e MSC (Ramsay et al., 1991).

A genética molecular oferece a possibilidade de transferir genes da síntese de PHA para uma grande variedade de microrganismos ou ainda plantas (Byrom, 1992). A análise da estrutura dos genes das enzimas da síntese de P(3HB) mostra que as

enzimas da via de síntese de PHA, β -cetotiolase (phbA), acetil-CoA redutase (phbB) e PHB sintetase (phbC) são organizadas em um operon único na *R. eutropha* dentro da ordem phbCAB (Schubert et al., 1991). Os três genes para a biossíntese de PHA em *R. eutropha* têm sido caracterizados e clonados em *E. coli* (Schubert et al., 1988; Slater et al., 1988; Peoples and Sinskey, 1989a e b).

A cepa de *E. coli* recombinante é capaz de acumular grandes quantidades de polímero, representando mais de 80% do peso celular seco (Fidler e Dennis, 1992; Lee, 1997). Além disso, *E. coli* pode utilizar várias fontes de carbono incluindo sacarose, lactose e xilose, o que permite a produção de P(3HB) a partir de matéria-prima barata tais como melão, soro de leite e hemicelulose hidrolisada (Lee, 1997, 1998; Lee e Chang, 1993; Lee et al., 1997; Zhang et al., 1994 citados por Choi e Lee, 1999b). Outra vantagem é que *E. coli* não possui depolimerases intracelular que degradam o P(3HB) acumulado (Choi e Lee, 1999b). Em compensação, uma desvantagem da produção de P(3HB) por *E. coli*, é a formação de filamentos. Células de *E. coli* sofrem considerável filamentação durante a síntese de P(3HB) e a extensão desta filamentação é muito maior em um meio definido quando comparado com um meio complexo ou semi-definido (Lee, 1994; Lee et al., 1994). Em um meio definido, a filamentação das células causa redução na velocidade de crescimento celular e menor atividade metabólica causando, conseqüentemente, menor acúmulo de P(3HB). Wang e Lee (1998), usando uma cepa de *E. coli*, geneticamente modificada para suprimir a formação de filamentos, conseguiu uma concentração de P(3HB) de 104 g.L^{-1} e uma produtividade de $2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ comparável com o obtido em *R. eutropha* (Kim et al., 1994). Esta concentração de 104 g.L^{-1} , foi a maior até agora conseguida usando *E. coli* recombinante em um meio definido.

A produção de PHA através de plantas transgênicas ainda está em seu início (Braunegg et al. 1998). As investigações relatam o uso da planta *Arabidopsis thaliana* hospedando genes de biossíntese de PHA da *R. eutropha*. Poirier et al. (1992), relataram com sucesso a expressão dos genes relacionados com a acetoacetil-CoA redutase e PHA sintetase no citoplasma da *A. thaliana*. O gene da 3-cetotiolase é endógeno no citoplasma da planta. Este experimento resultou na síntese de P(3HB) no citoplasma, núcleo e vacúolos de todo o tecido da planta, mas em pequenas quantidades e à custa de um crescimento retardado da planta. Em

compensação, quando os três genes relacionados com a síntese de P(3HB) em *R. eutropha* foi expresso nos cloroplastos da *A. thaliana*, a planta transgênica exibiu um crescimento normal e teve um conteúdo de P(3HB) de aproximadamente 14% de seu peso seco (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998). A companhia Imperial Chemical Industries (ICI) (Inglaterra), investe no desenvolvimento da produção de P(3HB) pela colza enquanto que a Monsanto (EUA) estuda a produção na colza e na soja (Poirier et al., 1995; Padgett et al., 1996).

Há estudos da biossíntese destes poliésteres *in vitro* a partir de lactonas ou ácidos hidroxialcanóicos empregando lipases, esterases e ainda proteases isoladas. A biossíntese de PHA *in vitro* revelará importantes dados sobre a formação dos grânulos de PHA e contribuirá para o conhecimento dos mecanismos catalíticos da PHA sintetase. Além disso, os processos *in vitro* permitirão a síntese de novos poliésteres e novos constituintes poderão ser incorporados aos PHAs (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

Ralstonia eutropha é o microrganismo mais atraente para a produção industrial. Este microrganismo pode acumular mais de 80% de sua massa celular em P(3HB) com um alto peso molecular e utilizando diferentes tipos de substratos (Byrom, 1987) como a glicose (espécie mutante) ou a frutose, o soro de leite fermentado e os açúcares invertidos de cana-de-açúcar (Ramsay, 1994a).

1.3- DESCRIÇÃO GERAL DA *R. eutropha*

Ralstonia eutropha (anteriormente *Hydrogenomonas eutropha* e depois *Alcaligenes eutrophus*) é um microrganismo procariótico, do tipo Gram-negativo. Esta espécie possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 µm. É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. As células podem se tornar esféricas na fase estacionária de crescimento.

Esta bactéria pode utilizar vários compostos orgânicos como única fonte de carbono, onde estão incluídos a glicose (espécie mutante), frutose, formato, acetato, propionato, lactato, gluconato, succinato, fenol, benzoato entre outros. Não pode utilizar

para este fim, o etanol, glicerol e dissacarídeos. A sua temperatura ótima de crescimento é de 30°C. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H₂, O₂ e CO₂ (Tanaka et al., 1994). A frutose, e no caso de mutantes, também a glicose, é metabolizada exclusivamente através da via de Entner-Doudoroff, já que *R. eutropha* não contém a enzima fosfo-frutoquinase, necessária para a degradação via glicólise. Os produtos desta via são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato assim produzido pode ser utilizado para a biossíntese e para a oxidação via ciclo do ácido tricarboxílico, para fornecimento de energia (Reutz et al., 1982).

A *R. eutropha* é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou de heterotrofia (Reutz et al., 1982). A quimiolitotrofia é a capacidade dos microrganismos de utilizar os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono. A heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono (Doelle, 1975).

O ciclo de Krebs faz parte do metabolismo central de *R. eutropha* (Figura 1.2). Uma característica bem particular deste ciclo em *R. eutropha* é a atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK). Esta enzima tem uma dupla função que varia de acordo com o substrato utilizado: uma função anaplerótica, que permite a formação do oxaloacetato a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) e uma função de gluconogênese, inversa ao precedente (Schobert e Bowien, 1984).

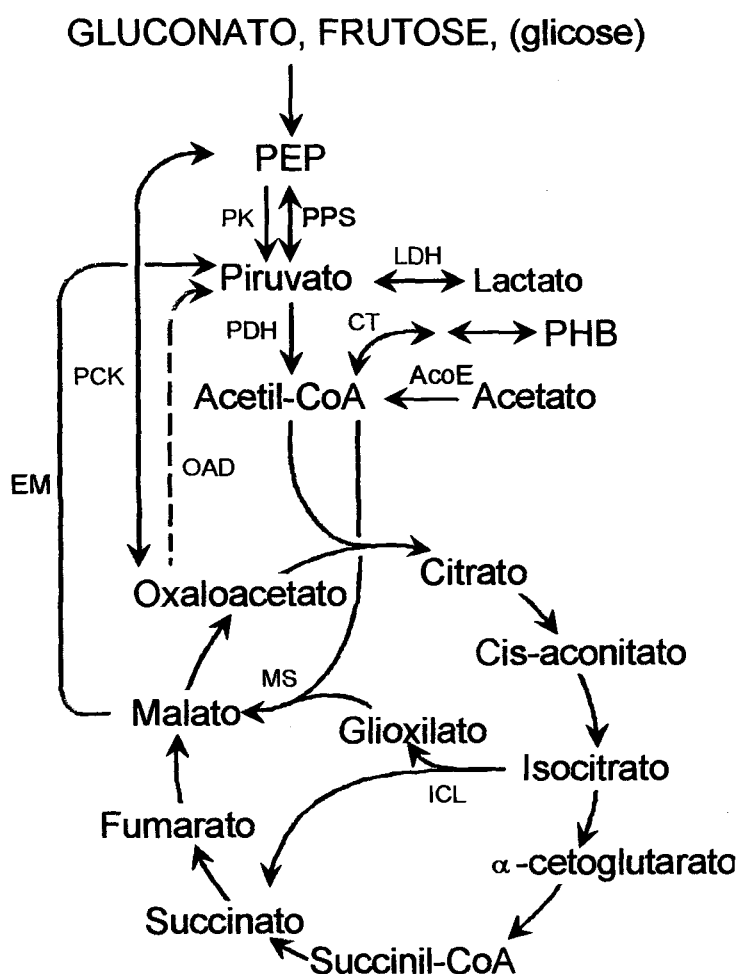


Figura 1.2- Metabolismo central da *R. eutropha* : ciclo de Krebs e enzimas em torno do piruvato e do acetato. AcoE: acetil-CoA sintetase; CT: β -cetotiolase; EM: enzima málica; ICL: isocitrato liase; MS: malato sintase; OAD: oxaloacetato descarboxilase; PCK: PEP carboxiquinase; PK: piruvato quinase; PPS: PEP sintetase (apresentado por Schobert e Bowien, 1984).

Schobert e Bowien (1984) estudaram o metabolismo dos substratos de 3 a 4 átomos de carbono e observaram um comportamento especial da PCK. Esta enzima foi identificada como a única que permite a carboxilação de carboidratos com C₃ em *R. eutropha*. O lactato, por exemplo, é catabolizado em piruvato depois em PEP, graças a PEP sintetase e enfim em oxaloacetato por meio da PCK. Um mutante, deficiente em PEP sintetase, tem um crescimento moderado sob succinato e acetato. Este fato mostra que a formação de PEP torna-se difícil na ausência desta enzima. As enzimas da via do glioxilato ou a enzima málica não podem garantir a via anaplerótica a partir do piruvato ou do lactato. A expressão das enzimas do ciclo do glioxilato é dependente do substrato e é mais importante sob acetato.

O principal desvio do piruvato para o ciclo de Krebs é a produção de P(3HB) via acetil-CoA.

1.4- BÍOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO PHA

O P(3HB) é sintetizado pela *R. eutropha* a partir de acetil-CoA que segue ora pelo ciclo de Krebs em crescimento não limitado, ora pela via de síntese de P(3HB) em crescimento limitado, mas em excesso de fonte de carbono. A produção de P(3HB) é favorecida pela limitação de um elemento nutritivo como o oxigênio, nitrogênio, fosfato, sulfato, magnésio ou potássio (Byrom, 1987; Dawes e Senior, 1973; Oeding e Schlegel, 1973; Schlegel et al., 1961; Daniel et al. 1992; Asenjo et al., 1995).

A biossíntese e a degradação de P(3HB) dentro da célula se desenvolve segundo um mecanismo cíclico (Senior e Dawes, 1973), como mostra a **Figura 1.3**.

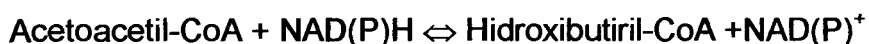
R. eutropha é capaz de produzir PHA tanto na forma de homopolímero de 3HB quanto na forma do heteropolímero poli(3HB-co-3HV) (Holmes, 1985).

3- β -cetotiolase. Concentrações elevadas de coenzima A, liberadas quando a acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, inibem a 3- β -cetotiolase.

Haywood et al. (1988a) descobriram a existência de dois tipos de 3- β -cetotiolase, que possuem especificidades diferentes de acordo com o substrato. A enzima denominada tipo A é ativa somente para os substratos com C₄ a C₅, enquanto que a outra, denominada tipo B, é ativa para substratos de cadeia de C₄ a C₁₀. Estudos *in vitro*, com as enzimas purificadas mostraram que as duas podem ser ativas na síntese de P(3HB). Haywood e colaboradores consideraram a hipótese de que a 3- β -cetotiolase do tipo B deve possuir uma outra função além daquela relacionada com a síntese de PHA, sendo, provavelmente, uma enzima degradativa relacionada com o metabolismo dos ácidos graxos.

1.4.1.1.2- Acetoacetil-CoA redutase

Esta enzima reduz o substrato a hidroxibutiril-CoA através da reação:



Dois tipos de acetoacetil-CoA redutase foram isoladas e estudadas por Haywood et al. (1988b) em *R. eutropha*, cada uma com um substrato distinto e coenzima específica. Uma das enzimas era a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) dependente e a outra tinha como coenzima a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A enzima NADPH-dependente é estereoespecífica, sendo ativa somente para substratos D(-)-3-hidroxi-acil-CoA. A melhor atividade desta enzima foi observada com substratos com cadeia C₄. No caso da enzima NADH-dependente, esta é ativa para substratos D(-) e L(+) com cadeias de 4 a 10 carbonos. A enzima NADH-dependente parece estar envolvida diretamente na β -oxidação dos ácidos graxos e indiretamente na síntese de P(3HB).

Os produtos da redução de acetoacetil-CoA são D(-)-3-hidroxibutiril-CoA e L(+)-3-hidroxibutiril-CoA para as enzimas NADPH-dependente e NADH-dependente, respectivamente.

Na síntese de P(3HB), apenas a enzima NADPH-dependente está envolvida, produzindo o substrato D(-)-3-hidroxibutiril-CoA, para a enzima PHB-sintetase.

1.4.1.1.3- PHA-sintetase

Em *R.eutropha*, esta enzima é capaz de polimerizar 3-hidroxi-, 4-hidroxi- e 5-hidroxiálcanoatos a partir de D isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxialcil-CoA (Haywood et al., 1989; Valentin et al., 1992), embora sua atividade seja bastante elevada com substratos de C₄ (Haywood et al., 1989). Se Nakamura et al. (1991) estiverem corretos em suas considerações, sobre a via para síntese de 3-hidroxipropionato, a PHA-sintetase deve também efetuar a polimerização em compostos com cadeia de 3 carbonos. Esta enzima é isolada sob duas formas, uma forma solúvel, predominante durante o crescimento não limitado, e outra em grânulo, associado quando as condições da cultura favorecem o acúmulo de P(3HB) (Haywood et al., 1989). Doi et al. (1992) estimaram que o número de moléculas de PHA-sintetase em *R. eutropha* esteja por volta de 18000. A quantidade de PHA-sintetase, em um organismo hospedeiro, representa uma função importante no controle do peso molecular do polímero (Sim et al., 1997). É possível que a PHA-sintetase seja inibida por concentrações elevadas de CoASH, ainda que estas concentrações sejam superiores às aquelas participantes da regulação da β -cetotiolase (Braunegg et al., 1998).

1.4.1.2-Recuperação das coenzimas

A síntese de P(3HB) não requer participação direta de ATP. Entretanto, o poder redutor na forma de NADPH é essencial. Na síntese de P(3HB), a partir de acetil-CoA, apenas a redutase ligada a NADPH é ativa. Portanto, o NADPH utilizado na reação abaixo deve ser recuperado para possibilitar a síntese de P(3HB):



Yamane (1993) considerou três possibilidades para a recuperação desta coenzima:

- a) por meio da reação que envolve a glicose-6-fosfato desidrogenase, que é uma enzima ligada à via de Entner-Doudoroff;

- b) através da reação que envolve a 6-fosfogluconato desidrogenase, que é uma enzima ligada à via das pentose-fosfato;
- c) e pela reação envolvendo a isocitrato desidrogenase, enzima ligada ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

A via utilizada para a regeneração das coenzimas reduzidas é relativa ao substrato utilizado para a produção do polímero. Se for utilizado ácido acético como substrato, há uma grande possibilidade da coenzima NADPH ser regenerada pela isocitrato desidrogenase. Pode ainda ocorrer uma outra possibilidade, com o mesmo substrato, que é a transidrogenação. Neste caso, a enzima isocitrato desidrogenase não é utilizada, sendo necessária uma suplementação de ATP, obtida através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). É necessário que parte do ácido acético seja utilizado na via TCA, para obtenção do ATP.

Utilizando-se um substrato com quatro carbonos na cadeia, como por exemplo o ácido butírico, NADPH deve ser recuperada pela isocitrato desidrogenase, no ciclo TCA. A partir da glicose como substrato, a NADPH deve ser regenerada pela glicose-6-fosfato desidrogenase.

Uma outra coenzima envolvida na síntese do polímero é a coenzima A. esta coenzima é auto-reciclável durante a produção de P(3HB).

1.4.2- DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE PHA

A degradação intracelular de P(3HB) é efetuada através de uma seqüência de reações envolvendo, nesta ordem, PHA depolimerase, D(-)-3-hidroxibutirato desidrogenase e acetoacetil sintetase para formar ácido D-3-hidroxibutírico e acetil-CoA (Doi, 1990). O acetoacetil-CoA é um intermediário comum para as vias de síntese e degradação de P(3HB). Doi et al.(1992) estudaram a cinética de acúmulo e degradação de P(3HB) em *R. eutropha* e descobriram que a degradação do polímero é dez vezes mais lenta que a sua síntese. A degradação de polímero é controlada pela inibição da 3-hidroxibutirato desidrogenase pelo acetoacetato e o NADPH (Byrom, 1987).

1.4.3- REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE PHA

As condições necessárias para a síntese de P(3HB) são elevadas concentrações de NADPH, baixas concentrações de CoA e uma alta concentração de acetil-CoA. A regulação da síntese de PHA se faz em nível enzimático pela inibição da β -cetotiolase por meio da coenzima A (Steinbüchel e Schlegel, 1991). Em crescimento não limitado, a concentração de CoA é presumivelmente alta, causando assim a inibição da enzima (Oeding e Schlegel, 1973). Um crescimento limitado em nutrientes (mas não limitado em fonte de carbono) se traduz em uma diminuição na concentração de CoA e acúmulo de acetil-CoA. O elemento limitante pode ser fósforo, potássio, magnésio, oxigênio, nitrogênio, etc (Steinbüchel e Schlegel, 1989). A influência da limitação de crescimento sobre a síntese de P(3HB) se expressa em uma parte pelo equilíbrio do nível redox (coenzimas reduzidas/coenzimas oxidadas) e, de outra parte, pela existência de um fluxo do catabolismo de carbono superior ao fluxo metabólico (Braunegg et al., 1998).

Em autotrofia, a síntese de P(3HB) é observada simultaneamente a uma diminuição da relação NADH/NAD^+ (Braunegg et al., 1998). Em heterotrofia, em condições de limitação, o aumento da síntese de P(3HB) é concomitante com o aumento da relação NADH/NAD^+ e $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (Lee et al., 1996). Sob limitação em oxigênio, a relação NADH/NAD^+ aumenta, por não existir aceptor final de elétrons na cadeia respiratória. As enzimas citrato sintetase e isocitrato desidrogenase, responsáveis pela entrada da acetil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), são inibidas pelo excesso de NADH, provocando um acúmulo de acetil-CoA e, conseqüentemente, a redução de CoA. Nestas condições de acúmulo de acetil-CoA e de não inibição da β -cetotiolase, ocorre a síntese do polímero. Henderson e Jones (1997) (citado por Braunegg et al., 1998) discutiram a função em potencial da citrato sintetase em regular a produção de P(3HB) através de sua habilidade de controlar o fluxo de carbono dentro do ciclo do ácido tricarboxílico, obtendo um grande acúmulo de polímero.

Senior e Dawes (1971) propuseram que a síntese de P(3HB) não funciona apenas como reserva de carbono e energia, mas serve também para a diminuição do poder redutor, podendo ser considerado como regulador do poder de óxido-redução da

célula. Dawes e Senior (1973) observaram que a síntese de P(3HB) foi acompanhada por um pronunciado aumento no poder de óxido-redução da cultura com concomitante queda nas taxas de utilização de oxigênio e evolução do gás carbônico concluindo, com isto que, durante a limitação de oxigênio, as células ajustam-se ao novo meio pela reoxidação do excesso do poder redutor, através da síntese de P(3HB).

A limitação nutricional mais empregada para a produção de P(3HB) é a deficiência em nitrogênio. Suzuki et al. (1986) consideraram a limitação em nitrogênio como a melhor escolha. Isto se deve ao fato do microrganismo ser mais dependente de nitrogênio do que de outros elementos limitantes e porque a fonte de nitrogênio é mais rapidamente assimilada do que outras fontes de elementos essenciais.

Sob limitação de nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP. O excesso de ATP provoca uma diminuição da fosforilação oxidativa e, dessa maneira, acúmulo das coenzimas reduzidas, com as mesmas conseqüências vistas na limitação em oxigênio (Dawes e Senior, 1973). Steinbüchel e Schlegel (1989) estudaram a produção de P(3HB) por *R. eutropha* sob condições de limitação de vários nutrientes essenciais, como oxigênio, amônia, sulfato, magnésio, fosfato, potássio e ferro, utilizando gluconato como fonte de carbono. Foi observado que, sob limitação em nitrogênio, *R. eutropha* acumulava polímero a uma taxa superior àquela obtida através da limitação em oxigênio. A **Figura 1.4** resume a regulação proposta pela literatura.

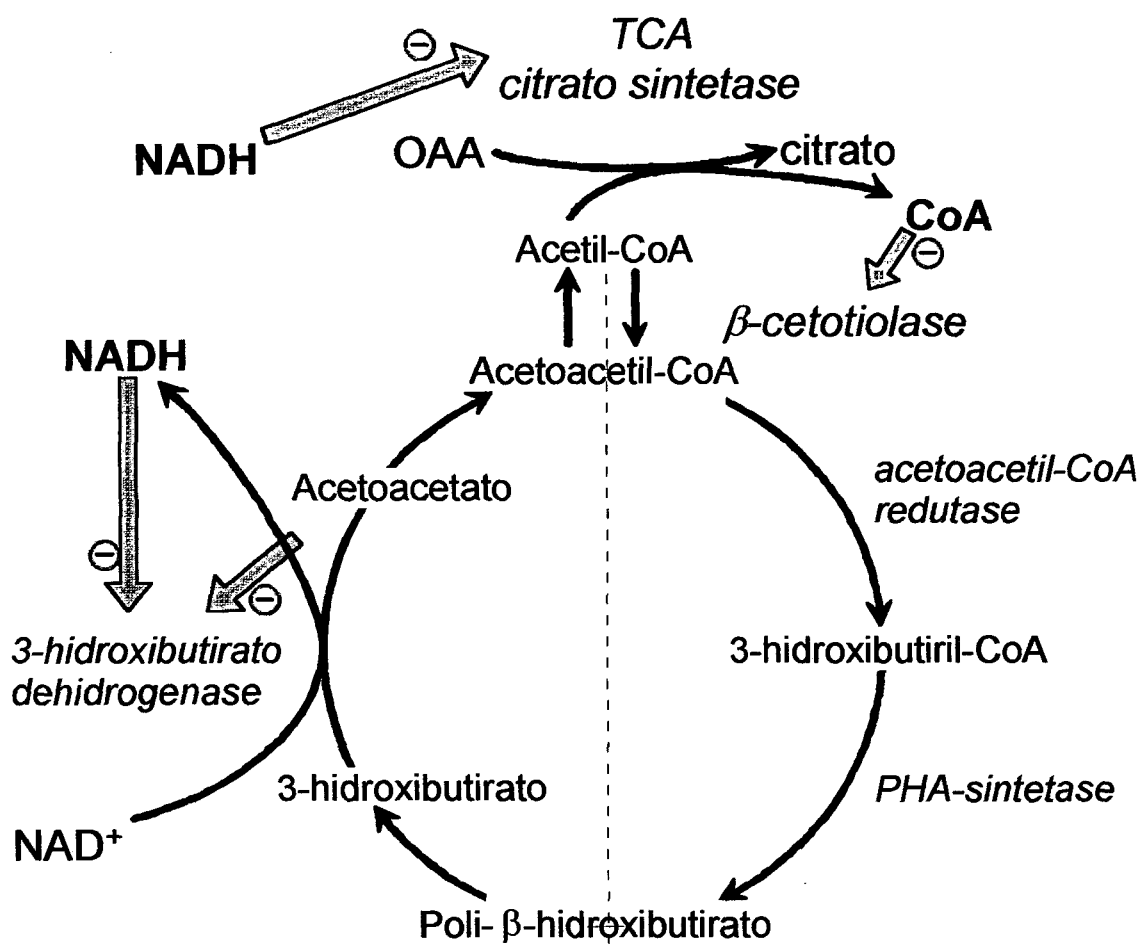


Figura 1.4- Biossíntese e degradação de P(3HB). Em condições de excesso de energia, o nível de NADH inibe a depolimerização de P(3HB) e o ciclo de Krebs (TCA). A diminuição da concentração em CoASH permite que a β-cetotiolase (acetil-CoA aciltransferase) possa catalisar a condensação de duas moléculas de acetil-CoA produzindo acetoacetil-CoA, o qual deve assim levar à síntese de P(3HB). Em deficiência de energia, o controle move-se no sentido inverso (Byrom, 1987).

1.5- PRODUÇÃO DE PHA

A produção de PHA por *R. eutropha* se faz normalmente em duas fases: uma primeira fase de crescimento não limitado em um elemento essencial (acúmulo de biomassa) e uma segunda fase de crescimento limitado (produção de PHA).

Uma série de pesquisas têm sido feitas para otimizar a produção de PHA. Entre elas destacam-se o uso de novos substratos, a utilização de novos microrganismos e uma melhor compreensão do metabolismo dos microrganismos produtores. Estas pesquisas envolvem a melhoria da produtividade e a obtenção de melhores fatores de conversão de substrato em produto, através do aperfeiçoamento dos sistemas de controle e desenvolvimento de novas técnicas de produção.

Com estes estudos, espera-se reduzir o custo de produção do PHA, dos atuais US\$ 16,00 Kg⁻¹, permitindo que este seja competitivo frente aos plásticos derivados do petróleo (Braunegg et al., 1998).

1.5.1- CULTURAS EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO

A produção de PHA em regime descontínuo é um processo simples de produção, porém, devido à limitação pelo substrato, não se consegue obter nestas culturas uma densidade celular elevada o suficiente para a produção comercial de biopolímero. Geralmente, a produção em escala industrial de P(3HB) é realizada em regime descontínuo alimentado (batelada alimentada). Na cultura em batelada alimentada, o biorreator é parcialmente preenchido com o meio de cultura e, à medida em que o processo vai se desenvolvendo, nutrientes são adicionados ao meio. Os produtos são retirados ao final da produção. Entre as vantagens do processo batelada alimentada, está a possibilidade de controlar os nutrientes alimentados através de mudanças nas taxas de alimentação (Borzani et al., 1983).

O processo industrial de produção de P(3HB) tem sido realizado pela Imperial Chemical Industries (ICI) em batelada alimentada (Byrom, 1987). Neste processo, a *R. eutropha* cresce em um meio contendo glicose e sais minerais sendo o fósforo o elemento limitante durante a fase de produção de P(3HB). O tempo total de cultura é

de 110 a 120 horas e a quantidade de polímero acumulada é superior a 75% da biomassa total seca.

Um método em batelada alimentada em dois estágios, onde foram empregados dois diferentes microrganismos, crescendo em dois substratos em um meio complexo, foi relatado por Tanaka et al. (1993) para produzir P(3HB). Em um primeiro estágio, xilose é convertida pela cepa de *Lactococcus lactis* em uma mistura de ácido láctico e ácido acético. Após a remoção de células por centrifugação, *R. eutropha* é inoculada no meio e passa a consumir os ácidos orgânicos ali presentes e produzir P(3HB). Embora o cultivo tenha sido realizado sem a presença de um elemento limitante, os autores relatam um acúmulo de até 55% de PHB na biomassa seca total.

1.5.2- INFLUÊNCIA DE UMA LIMITAÇÃO OU DE UMA CARÊNCIA SOBRE A PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Embora a limitação da fonte de nitrogênio estimule a síntese de P(3HB), a sua completa deficiência pode levar a uma perda considerável da atividade microbiana (Suzuki et al., 1986). Suzuki et al. (1986) estudaram a cinética de produção de P(3HB) em cultura batelada alimentada de *Protomonas extorquens*, mostrando que a adição de nitrogênio foi necessária, mesmo na fase de acúmulo. Foi observado que a alimentação de pequena quantidade de nitrogênio, durante a fase de produção de P(3HB), é desejada para a manutenção da atividade anabólica de acúmulo do biopolímero. Entretanto, a alimentação excessiva de nitrogênio causava a degradação do P(3HB) já acumulado e a redução da capacidade microbiana de sintetizar o polímero.

Bitar e Underhill (1990) estudaram a cinética de acúmulo de P(3HB) em *R. eutropha* durante o crescimento sob carência e alimentação, na fase de produção, de nitrogênio. Quando a amônia foi fornecida ao meio a uma taxa de $0,00065 \text{ g.h}^{-1}$, a produtividade de P(3HB) aumentou de $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $0,99 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O conteúdo de P(3HB) acumulado foi de 70% da biomassa total seca. Em 29 horas de experimento, a cultura suplementada em nitrogênio alcançou um conteúdo de peso seco de 62% de P(3HB) enquanto que, no mesmo período, a cultura não suplementada possuía um conteúdo de P(3HB) de apenas 42,5%. Além disso, o fator de conversão glicose em

P(3HB) foi de $0,2 \text{ g.g}^{-1}$ para a cultura não alimentada enquanto que, para a cultura alimentada em nitrogênio, o fator de conversão glicose em P(3HB) foi de $0,447 \text{ g.g}^{-1}$.

Estudos sob carência em fósforo apresentam resultados ainda melhores do que sob carência ou alimentação controlada de nitrogênio. Ryu et al. (1997), trabalhando em cultura batelada alimentada de *R. eutropha*, sob limitação em fósforo e em um fermentador de 60 L, conseguiram os melhores resultados até agora relatados para a produção de P(3HB). Em seus experimentos, o acúmulo de P(3HB) foi induzido pela limitação em fosfato e o controle de pH realizado usando uma solução de NH_4OH . A partir de uma concentração inicial de fosfato de $5,5 \text{ g.L}^{-1}$, a cultura em batelada alimentada resultou em uma concentração celular final de 281 g.L^{-1} , concentração de P(3HB) de 232 g.L^{-1} e uma produtividade de $3,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O conteúdo de P(3HB) nas células alcançou 80% com um fator de conversão substrato em P(3HB) de $0,38 \text{ g.g}^{-1}$. Aragão (1996) acredita que a maior produtividade obtida sob carência em fósforo se deve ao fato de que este elemento não faz parte da composição de proteínas e com isso há um crescimento residual de biomassa com acúmulo de P(3HB).

1.5.3- UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

A avaliação econômica do processo de produção de P(3HB) indica que o custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global de produção, podendo representar mais de 38 % segundo Choi e Lee (1999a). Por isso, vários estudos usando substratos de baixo custo foram desenvolvidos.

Kim e Chang (1998) estudaram o uso de amido hidrolisado como fonte de carbono para culturas de *Azotobacter chroococcum*, conseguindo, em batelada alimentada, uma concentração celular de 54 g.L^{-1} com 46% de P(3HB) sob limitação em oxigênio. Eles atribuíram como vantagens neste experimento a capacidade do microrganismo não exigir grandes quantidades de sais e acumular P(3HB) em condições de limitação de oxigênio, o que, segundo eles, ocorre frequentemente em operações em larga escala. Ainda de acordo com estes pesquisadores, a otimização das condições de cultura para *A. chroococcum* pode tornar este microrganismo um bom candidato para a produção industrial de P(3HB), principalmente pela sua capacidade de consumir uma fonte de carbono barata como é o amido.

A biossíntese de PHA por *Pseudomonas resinovorans* a partir de gorduras de origem animal e vegetal foi investigado por Ashby e Foglia (1998). Nestes experimentos foram obtidos PHAs de cadeia longa, principalmente polihidroxiocetanoatos e polihidroxidecanoatos. Como estes polímeros são aderentes à temperatura ambiente, os autores acreditam que existe a possibilidade de aplicá-los como material adesivo ou, então, desenvolver um *blend* com P(3HB) para ampliar a aplicação destes polímeros.

Outro estudo com óleos vegetais foi feito por Fukui e Doi (1998) sobre culturas de *R. eutropha* H16 (ATCC 17699). Quando óleo de oliva, milho ou palma foram usados como única fonte de carbono, a *R. eutropha* acumulou em torno de 80% de seu peso celular seco em P(3HB). Eles verificaram que, utilizando o óleo de oliva, a *R. eutropha* secretava lipase e sugeriram que esta enzima hidrolisava os triglicerídeos no meio, o que resultava na incorporação dos ácidos graxos pelas células e metabolização destes ácidos a aceto-CoA através do ciclo de β -oxidação dos ácidos graxos. Fukui e Doi previram que a aplicação dos óleos vegetais como fonte de carbono para a biossíntese de PHA seja capaz de reduzir os custos de produção destes poliésteres.

Wong e Lee (1998) pesquisaram o uso de soro de leite como substrato para a cultura de *E. coli* recombinante. O soro de leite é o maior subproduto da manufatura de queijo e caseína, representando de 80 a 90% do volume de leite transformado. Quando alimentado com uma solução de soro de leite concentrada de 210 g.L⁻¹ de lactose, conseguiu-se uma concentração celular seca de 87 g.L⁻¹ e uma concentração de P(3HB) de 69 g.L⁻¹ em regime batelada alimentada durante 49 horas. O conteúdo de P(3HB) foi de 80% da biomassa total seca e com uma produtividade em polímero de 1,4 g.L⁻¹.h⁻¹. Neste trabalho concluiu-se que é possível aproveitar o soro de leite como fonte de carbono para as culturas de *E. coli* produzirem P(3HB). O soro de leite, dessa forma, deixaria de ser mais um resíduo causador de danos ao ambiente para passar a ser uma fonte de carbono aproveitável na produção de biopolímero.

Outro subproduto da indústria que vem sendo estudado como fonte alternativa de carbono na produção de biopolímero é o melaço. Este substrato é largamente usado como fonte de carbono em fermentações envolvendo leveduras (Peppler, 1979, citado por Beaulieu et al., 1995). Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém

elementos traços e vitaminas tais como tiamina, riboflavina, piridoxina e niacinamida (Crueger e Crueger, 1984, citado por Beaulieu et al., 1995).

Liu et al. (1998) tiveram êxito em usar melaço de beterraba como única fonte de carbono para produzir P(3HB) em cultura batelada alimentada de *E. coli* recombinante. O melaço de beterraba foi hidrolisado e considerou-se que 60 g.L^{-1} de melaço seria a concentração ideal de substrato para a síntese de P(3HB). Os resultados de peso celular seco, conteúdo de P(3HB) e produtividade de P(3HB) foram de $39,5 \text{ g.L}^{-1}$, 80% (p/p) e $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente, em um fermentador de 5 L e após 31,5 horas de cultura.

No Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT (IPT, 1993) foram realizados estudos com melaço de cana invertido, que eles denominaram de HTM (*High Test Molasses*). Os ensaios foram desenvolvidos usando nitrogênio como elemento limitante e utilizando, como cepa produtora de biopolímero, a *R. eutropha* DSM 545. Os resultados obtidos foram comparáveis àqueles obtidos para glicose com um acúmulo de P(3HB) em biomassa seca de 74% (p/p) e uma produtividade de $0,9 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Outro estudo com melaço de cana foi realizado por Beaulieu et al. (1995). Neste trabalho, o melaço de cana foi usado como fator de crescimento para culturas de *R. eutropha* devido ao seu conteúdo em vitaminas e sais minerais. Os experimentos foram desenvolvidos em frascos Erlenmeyer contendo glicose como fonte única de carbono. Eles concluíram que uma concentração de 0,3% de melaço de cana, como fator de crescimento, maximizava a produção de P(3HB) ao estimular um aumento na formação de biomassa durante a fase de crescimento não limitado.

1.5.4- CONTROLE DE pH

O controle de pH é um fator importante na biossíntese de P(3HB). O pH na cultura de *R. eutropha* geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs. Repaske, 1962 (citado por Beaulieu et al., 1995) já relatava que um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) em *R. eutropha* era de 6,9 e que um pH de 5,4 inibia o seu crescimento. O uso de tampão fosfato para manter o pH em 7,0 para a cultura de *R. eutropha* foi pesquisado por Kim, 1988 (citado por Seo et al., 1998) mas a concentração de subprodutos produzidos pelo ciclo de Krebs excederam a capacidade

da solução tampão de fosfato de potássio 5 g.L^{-1} de manter o pH em 7,0. O uso de concentrações maiores desse tampão inibiam o crescimento celular.

Geralmente usa-se soluções de HCl e NaOH para controlar o pH, porém estas soluções são conhecidas como desnaturantes de proteínas (Morrison e Boyd, 1983).

Seo et al. (1998) estabeleceram as condições ótimas de crescimento para *R. eutropha* sob carência em nitrogênio e testaram soluções de NaOH, KOH, Na_2CO_3 e uma mistura de NaOH mais KOH como soluções controladoras de pH. Eles verificaram que a mistura de NaOH e KOH maximizavam as concentrações de células e de P(3HB) do que usando somente NaOH ou KOH e também que a melhor solução testada para o controle de pH foi a de Na_2CO_3 , provavelmente porque o CO_2 gerado a partir desta solução podia ser usado como fonte de carbono para *R. eutropha*.

1.6- RECUPERAÇÃO DO PHA INTRACELULAR

Os PHAs são geralmente recuperados das células produtoras por meio de solventes ou misturas destes (Braunegg et al., 1998).

Os processos de separação de PHA da biomassa podem ser divididos em duas categorias: (a) solubilização seletiva de PHA em solvente orgânico, deixando a biomassa restante em suspensão e (b) destruição (solubilização) dos componentes celulares outros que não o PHA, deixando os grânulos de PHA em suspensão (Ramsay, 1994b).

Compostos polares brandos como acetona e álcoois (Holmes et al., 1980) fragilizam ou destroem o material celular não polimérico (*non polymer cell material* – NPCM), deixando intacto os grânulos de P(3HB), embora alguns PHAs de cadeia longa sejam solúveis em acetona (Brandi et al., 1988). NPCMs consistem principalmente de ácidos nucleicos, lipídeos e fosfolipídeos, peptidoglicanos e proteínas.

A maioria dos processos de recuperação utilizam solventes orgânicos (Ramsay, 1994b). Embora a extração por solvente seja amplamente usado para recuperar P(3HB) com elevada pureza, este método requer grandes quantidades de solventes tóxicos e/ou voláteis, o que não apenas aumenta o custo total de produção como também causa danos ao meio ambiente (Choi e Lee, 1997).

A digestão de NPCM também pode ser obtida com soluções alcalinas de hipoclorito de sódio (Berger et al., 1989). Entretanto, durante a digestão do material celular não polimérico, é observado severa degradação de PHA resultando na perda de peso molecular do polímero (Berger et al., 1989). De acordo com Asenjo et al. (1995) um baixo peso molecular do polímero associado a uma ampla distribuição destes pesos moleculares são fatores indesejáveis para a produção industrial. Entretanto, fazendo um pré-tratamento com surfactante e a digestão com hipoclorito sob condições ótimas (pH, temperatura, duração e relação biomassa/fase aquosa), se obtém um biopolímero menos degradado e com alta pureza (Ramsay et al., 1990b).

Processos sem solventes têm sido desenvolvidos pela Zeneca BioProducts (Inglaterra) para recuperar P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Primeiro, há o tratamento das células a alta temperatura (100-150°C), provocando a lise celular e a desnaturação dos ácidos nucleicos. O material celular não polimérico é então solubilizado por meio de enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina, papaína, entre outros) e surfactantes não iônicos. O PHA, separado por centrifugação, é finalmente clareado por lavagem com peróxido de hidrogênio.

Recentemente, Choi e Lee (1999b) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para recuperar P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante. Quando as células de *E. coli* recombinante contendo 77% de P(3HB) foram tratadas com NaOH 0,2 M a 30°C durante 1 hora, o P(3HB) foi recuperado com uma pureza de 98,5%. Empregando o método de digestão alcalina, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor que o obtido empregando o método de digestão por surfactante-hipoclorito.

1.7- APLICAÇÕES DO PHA

Devido às características que possuem os P(3HB) e P(3HB-co-3HV), estes PHAs foram inicialmente usados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis, bem como, sacos de proteção para plantas. Além disso, um latex de PHAs pode ser aplicado em papel ou papelão para formar uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável, o que é uma alternativa aos materiais compostos não biodegradáveis preparados a partir de, por exemplo, papelão mais polietileno ou alumínio (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

Os PHAs também têm suas aplicações na área médica, tais como, materiais osteosintéticos e suturas cirúrgicas. Estes biopolímeros podem ser aplicados como matriz de materiais para liberação lenta de drogas, hormônios, herbicidas, inseticidas e fragrâncias para as indústrias farmacêutica e de alimentos. As aplicações médicas e farmacêuticas do P(3HB) são, todavia, restritas devido a sua biodegradação muito lenta e elevada estabilidade hidrolítica em tecidos estéreis. Finalmente, está sendo estudado o uso de PHAs como matéria-prima para a produção de tintas. (Steinbüchel e Fächtenbusch, 1998).

1.8- BIODEGRADABILIDADE

Biodegradabilidade é a capacidade de decomposição de materiais, em compostos inócuos, pela ação de seres vivos como, por exemplo, os microrganismos. Bactérias e fungos são os principais participantes no processo de biodegradação na natureza. A quebra destes materiais fornece aos microrganismos os precursores dos componentes celulares além de energia, ou seja, a biodegradação nada mais é que um processo catabólico (Braunegg et al., 1998).

P(3HB) e P(3HB-co-3HV) são degradados tanto em sistemas biológicos aeróbicos quanto em sistemas biológicos anaeróbicos pela ação de enzimas extracelulares secretadas pelos microrganismos. A degradação ocorre mais rapidamente em despejos anaeróbicos e mais lentamente no mar. Em ambientes aeróbicos, os produtos finais são dióxido de carbono, água e húmus. Sob condições anaeróbicas, metano também é produzido. Durante o processo de degradação não há a produção de intermediários nocivos (Luzier, 1992).

As velocidades de biodegradação dependem de uma série de fatores, incluindo área superficial, atividade microbiana, ambiente disponível, pH, temperatura, nível de mistura e presença de outros materiais nutrientes. Kunioka et al. (1989) estudaram a degradação hidrolítica e enzimática de filmes de P(3HB), P(3HB-co-3HV) e poli-3-hidroxisalicato-co-4-hidroxi-butarato (P(3HV-co-4HB)) em vários ambientes. Eles verificaram que a presença de unidades de 4HB acentuavam as velocidades de degradação dos dois processos. Nakamura et al. (1992) expuseram filmes de P(3HB-co-4HB) à ação de PHA depolimerase isolada de *Alcaligenes faecalis*. A degradação

enzimática foi acelerada para frações de 4HB acima de 28 mol%, mas a depolimerização foi inibida para frações de 4HB acima de 85 mol%. Em outro experimento similar (Kang et al., 1995), a fração crítica de 4HB era de 13 mol%, fração para a qual a velocidade de degradação era 10 vezes mais rápida do que o homopolímero P(3HB). Doi et al. (1990) consideraram que esta aceleração possa ser atribuída ao decréscimo da cristalinidade dos copolímeros de 4HB em relação aos polímeros de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), oferecendo às enzimas degradativas melhor acesso às cadeias poliméricas.

Nishida e Tokiwa (1993) sugerem que dois diferentes métodos de ataque microbiano ocorrem em P(3HB): uma degradação preferencial às regiões amorfas do polímero pela depolimerase extracelular, seguido da colonização bacteriana da superfície do filme, com subsequente degradação localizada.

Uma importante perda de massa (50-100%) de amostras de P(3HB-co-3HV) exposta durante 120 dias em lodos ativados foi observado por Gilmore et al. (1993) que demonstraram que a degradação resultava inteiramente da atividade biológica. A partir de experimentos em laboratório, Briese et al. (1994) relataram que a degradação de P(3HB-co-3HV) em despejo de lodo aeróbico era fortemente dependente do pH, com uma faixa de valores entre 7 e 8,5.

1.9- FATORES QUE INFLUENCIAM O CUSTO DE PRODUÇÃO DE PHA

Como foi observado ao longo desta revisão, os PHAs são substitutos ideais dos plásticos derivados do petróleo por terem propriedades similares a vários termoplásticos e elastômeros, além de serem completamente biodegradáveis. Porém, o uso do PHA em uma faixa maior de aplicações é limitado principalmente pelo alto custo de produção deste biopolímero, quando comparado aos polímeros de origem petroquímica (Byrom, 1987).

Com o objetivo de reduzir o custo de produção e tornar o PHA um produto mais competitivo frente aos plásticos não biodegradáveis, se tem procurado desenvolver melhores cepas de microrganismos produtores e processos mais eficientes de produção e recuperação de PHA (Lee, 1996a e b). Estes esforços permitiram, por exemplo, reduzir drasticamente o valor do copolímero P(3HB-co-3HV) (Luzier, 1992).

Este copolímero é comercializado pela Monsanto com o nome de Biopol e sua produção anual é de aproximadamente 800 toneladas (Braunegg, 1998). O Biopol teve seu preço reduzido de US\$ 800,00 Kg⁻¹, no início da década de 1980, para US\$ 16,00 Kg⁻¹ em 1989 (Luzier, 1992). Ainda assim, este valor continua sendo muito elevado quando comparado com o preço de mercado de plásticos como o polietileno e o polipropileno que custam menos de US\$ 1,00 Kg⁻¹ (Poirier et al., 1995).

Entre os fatores que afetam o custo final de produção de PHA, encontram-se: produtividade de PHA, conteúdo de PHA, fator de conversão de substrato em biopolímero, preço da fonte de carbono e método de recuperação empregado.

1.9.1- PRODUTIVIDADE DE PHA

A produtividade é definida como sendo a quantidade de produto produzido por unidade de volume e unidade de tempo. Para a produção de mesma quantidade de PHA por ano, o processo com menor produtividade requer um equipamento maior. Por exemplo, assumindo que um determinado processo produza 100 gPHA.L⁻¹ em 50 horas (produtividade de 2 gPHA.L⁻¹.h⁻¹). Entretanto, se em 50 h fosse obtido 50 gPHA.L⁻¹ (produtividade de 1 gPHA.L⁻¹.h⁻¹), um biorreator duas vezes maior seria necessário para atender a mesma finalidade (Choi e Lee, 1999a).

Comparando-se dois processos de produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante com duas diferentes produtividades, para uma capacidade de produção estimada de 100000 ton/ano, é possível ver o efeito da produtividade sobre o custo de produção (Choi e Lee 1997, 1999). Quando a produtividade de P(3HB) aumentou de 1,98 g.L⁻¹.h⁻¹ para 3,20 g.L⁻¹.h⁻¹, o custo operacional de produção de P(3HB) reduziu de US\$ 5,37 Kg⁻¹ para US\$ 4,91 Kg⁻¹ de P(3HB). Uma avaliação econômica mostrou que o aumento da produtividade provocou a redução dos custos de capital fixo direto, mão-de-obra e equipamentos (Choi e Lee 1997, 1999a). A **Tabela 1.1** apresenta o custo operacional estimado, fornecido por Choi e Lee (1999a), para a produção de 100000 toneladas/ano de P(3HB) usando diversos microrganismos.

Tabela 1.1- Estimativa do custo operacional de produção de 100000 toneladas/ano de P(3HB) com *A. latus*, *M. organophilum* e *E. coli* recombinante como microrganismos produtores. O P(3HB) foi recuperado por surfactante e hipoclorito (Choi e Lee, 1999a).

Parâmetros	<i>A.latus</i> ^a	<i>A.latus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>M. organophilum</i>
Desempenho da cultura					
Tempo de cultura (h)	18	20	41	49	70
Concentração celular (g.L ⁻¹)	143	111,7	112	204,3	250
Concentração de P(3HB) (g.L ⁻¹)	71,4	98,7	81	157,1	130
Conteúdo de P(3HB) (%)	50	88	72,3	77	52
Produtividade de P(3HB) (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	3,97	4,94	1,98	3,2	1,86
Fator de conversão (gP(3HB)/gcarbono)	0,17	0,42	0,29	0,27	0,19
Avaliação econômica					
Custo do capital fixo direto	1,42	0,73	1,31	1,00	1,57
Custo da mão-de-obra	0,20	0,12	0,21	0,16	0,23
Administração	0,09	0,05	0,09	0,08	0,11
Custo da matéria-prima	4,94	1,26	2,99	2,97	3,31
Equipamentos	0,49	0,29	0,42	0,36	0,46
Tratamento/remoção de resíduos	1,13	0,15	0,35	0,34	1,01
Custo total de produção (US\$/KgP(3HB))	8,30	2,60	5,37	4,91	6,69

a- uma elevada concentração de inóculo (13,70 g de células secas.L⁻¹) foi usado.

1.9.2- CONTEÚDO DE PHA EM CÉLULAS

Choi e Lee (1999a) consideraram que o conteúdo de PHA afetava a eficiência do processo de recuperação e também o fator de conversão de substrato em PHA. O grau de pureza e o rendimento de PHA recuperado é fortemente dependente de seu conteúdo na biomassa. A recuperação de biopolímero da célula é facilitada por um conteúdo elevado de PHA.

A influência do conteúdo de PHA sobre o fator de conversão de substrato em polímero foi analisado por Choi e Lee (1999a) que compararam duas culturas em batelada alimentada de *A. latus*. Para a cultura batelada alimentada de *A. latus* onde se

obteve um conteúdo de P(3HB) de 50%, o fator de conversão de substrato em P(3HB) foi de apenas 0,17 gP(3HB)/gsacarose (Yamane et al., 1996). No entanto, quando o conteúdo de P(3HB) aumentou para 88% da biomassa seca total, aplicando limitação em nitrogênio, o fator de conversão foi de 0,42 gP(3HB)/gsacarose (Wang e Lee, 1997). A análise econômica destes processos demonstraram que o custo de recuperação decresceu com o aumento do conteúdo de P(3HB) (Lee e Choi, 1998). O conteúdo de P(3HB) de 50% resultou em um custo de recuperação de US\$ 4,80 Kg⁻¹ de P(3HB), enquanto que, para o processo que obteve um conteúdo de 88% de P(3HB) o custo foi de US\$ 0,92 Kg⁻¹ de P(3HB) (Lee e Choi, 1998). Comparando os dois processos, percebeu-se que o menor conteúdo de P(3HB) resultou em um maior custo de recuperação devido, principalmente, ao uso de grandes quantidades de agentes químicos para separar o P(3HB) e ao aumento no custo do tratamento dos resíduos. O custo dos equipamentos também aumentou com um menor conteúdo de PHA porque uma grande quantidade de células passa a ser necessária para obter a mesma quantidade de PHA.

1.9.3- CUSTO DA FONTE DE CARBONO

O custo da fonte de carbono contribui significativamente para o custo de produção global de PHA (Yamane 1992, 1993). Choi e Lee (1999a) verificaram que para um processo usando *E. coli* recombinante com uma concentração de P(3HB) de 157 g.L⁻¹, um conteúdo de 77% de P(3HB) e uma produtividade de 3,2 g.L⁻¹.h⁻¹ de P(3HB), o custo da fonte de carbono representava algo em torno de 38% do custo total de produção para uma escala de produção assumida de 100000 ton/ano.

O uso de fontes de carbono de baixo custo pode reduzir o custo de produção de P(3HB). Se amido de milho (US\$ 0,22 Kg⁻¹) for usado no lugar de glicose (US\$ 0,51 Kg⁻¹) para a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante, sem modificar as condições de processo, o custo de produção de P(3HB) decrescerá de US\$ 4,91 Kg⁻¹ para US\$ 3,72 Kg⁻¹ (Choi e Lee, 1999a).

A Tabela 1.2 apresenta o custo das fontes de carbono com base nos fatores de conversão teóricos (Lee, 1996a).

Tabela 1.2- Efeito do custo do substrato e do fator de conversão em P(3HB) sobre o custo de produção de P(3HB) (apresentado por Lee 1996a).

Substrato	Preço aproximado (US\$ Kg ⁻¹)	Fator de conversão em P(3HB) [(gP(3HB) (gsubstrato) ⁻¹]	Custo do substrato {US\$ [(Kg P(3HB)) ⁻¹ }
Glicose	0,493 ^a (0,220 ^c)	0,38 ^b	1,30 (0,58)
Sacarose	0,290 ^d	0,40	0,72
Metanol	0,180 ^e	0,43	0,42
Acetato	0,595 ^e	0,38	1,56
Etanol	0,502 ^a	0,50	1,00
Melaço de cana	0,220 ^a	0,42	0,52
Soro de queijo	0,071 ^a	0,33	0,22
Hemicelulose hidrolisada	0,069 ^a	0,20	0,34

a- Dado obtido de Hocking e Marchessault (1994)

b- Calculado multiplicando o fator de conversão teórico por 0,80 (assumindo 80% de polímero acumulado) (Yamane 1992, 1993).

c- Estimado do valor do amido de milho hidrolisado.

d- Preço de mercado internacional do açúcar bruto.

e- Preço internacional obtido do *Chemical Journal* (Korea).

1.9.4- INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO

Fornecer oxigênio suficiente para manter as condições aeróbicas adequadas pode ser potencialmente oneroso (van Wegen et al., 1998). Quando PHA é produzido em culturas de alta concentração celular, o oxigênio dissolvido frequentemente atua como um fator limitante (Lee, 1996c). A prevenção da limitação do oxigênio geralmente requer um vaso pressurizado, elevada energia de mistura, elevadas vazões de gás e alimentação de ar enriquecido com oxigênio (Choi e Lee, 1999a).

Neste caso, é interessante também pesquisar cepas capazes de obter uma elevada produção de PHA sob limitação em oxigênio. Wang e Lee (1997b) trabalhando sob limitação em oxigênio (1-3% de ar saturado) para culturas batelada alimentada de *E. coli* recombinante, conseguiram uma elevada concentração de P(3HB) que foi de

157,1 g.L⁻¹ com um conteúdo de 77% de P(3HB) e uma produtividade de 3,2 gP(3HB).L⁻¹.h⁻¹, o que é considerado bastante alto.

1.9.5- MÉTODO DE RECUPERAÇÃO

Em um processo de recuperação, os grânulos de PHA não devem conter muitos contaminantes (Steinbüchel et al., 1995). PHA altamente puro deve ser obtido pelo processo de quebra da célula e solubilização do material celular outros que não o PHA. Assim sendo, os métodos de digestão simples através de produtos químicos de baixo custo são os mais eficientes e econômicos para a recuperação de PHA. Tais métodos são especialmente eficientes na recuperação de PHA em células com elevado conteúdo de biopolímero e são aplicados na obtenção de PHA altamente puro em várias bactérias (Choi e Lee 1999b). Quando *A. vinelandii* UWD foi cultivada em um meio suplementado com peptona de peixe, as células tomaram-se frágeis. Um tratamento simples com NH₄OH 1 M durante 10 minutos resultou em uma pureza de 94% (Page e Comish, 1993).

Choi e Lee (1999b) recuperaram P(3HB) de células de *E. coli* recombinante com uma pureza de 98,5% usando no processo uma solução de NaOH 2 M por um período de duas horas. Este método permitiu uma redução de 25% nos custos de produção quando comparado com o método de digestão por surfactante-hipoclorito. A redução no custo de produção encontra-se, principalmente, na redução do custo de tratamento de resíduos que, segundo o trabalho, reduziu de US\$ 0,34 Kg⁻¹ para US\$ 0,02 Kg⁻¹ usando o tratamento alcalino.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- LINHAGEM BACTERIANA E MEIOS DE CULTURA

A linhagem de microrganismo utilizada foi a *R. eutropha* DSM 545 devido à sua capacidade de utilizar glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo). A cepa de *R. eutropha* é mantida em um meio ágar nutriente (NA) sob refrigeração. A composição deste meio é de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5% de ágar.

Dois meios de cultura líquidos são utilizados:

- o meio NB, utilizado na primeira pré-cultura, possui a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g.L⁻¹; extrato de carne 3,0 g.L⁻¹.
- o meio mineral (MM), utilizado na segunda pré-cultura e como meio final, é baseado em Ramsay et al.(1990), cuja a composição é dada na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 – Composição do meio MM

		g.L ^{-1a}
SOLUÇÃO 1	Ácido nitriloacético	0,19
	Citrato ferroso de amônia	0,06
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
	Solução de oligo-elementos ^b	1mL.L ⁻¹
SOLUÇÃO 2	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	8,95
	KH ₂ PO ₄	1,5
SOLUÇÃO 3	Fonte de carbono ^c	

^a concentrações dadas por litro de meio

^b a composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na **Tabela 2.2**

^c a composição e concentração da fonte de carbono depende do estudo realizado

O pH da solução 1 é ajustado a 7,0 com NaOH 20%. As soluções 1, 2 e 3 são autoclavadas separadamente durante 20 minutos a 120°C e adicionadas assepticamente para formar o meio final.

As concentrações das soluções concentradas de fontes de carbono foram: glicose 200 ou 500 g.L⁻¹, açúcar invertido 200, 500 ou 800 g.L⁻¹ e ácido láctico 200 g.L⁻¹ que teve o seu pH corrigido para 7,0 usando NH₄OH.

Tabela 2.2 – Composição da solução concentrada de oligo-elementos.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01

2.2- CONDIÇÕES DE CULTURA

2.2.1- PRÉ-CULTURAS

Preparou-se duas pré-culturas, a primeira é realizada em um frasco Erlenmeyer aletado de 300 mL contendo 100 mL de meio NB inoculado com duas a três alçadas da cepa mantida em meio ágar. Esta pré-cultura é incubada durante 24 h à temperatura de 30°C, sob agitação de 100 rpm. Após este período um segundo frasco Erlenmeyer aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio MM recebe uma quantidade correspondente a 10% de seu volume final de inóculo proveniente do meio NB. Este meio MM também é incubado durante 24 h à temperatura de 30°C e agitação de 100 rpm.

2.2.2- CULTURAS EM FRASCOS ERLENMEYER

Nas análises preliminares, a cultura final para o crescimento do microrganismo é feita em frasco Erlenmeyer aletado de 1000 mL, contendo 300 mL de meio MM e

incubada à temperatura de 30°C, sob agitação de 100 rpm. A inoculação é feita a 10% de seu volume a partir da pré-cultura anteriormente preparada em meio MM.

2.2.3- CULTURAS EM FERMENTADOR

As culturas são realizadas em fermentador de 5 L (BIOFLO III, fabricado pela New Brunswick Scientific CO.). O fermentador, contendo a solução 1 do meio MM (item 2.1), é autoclavado durante 20 minutos a 120°C. O volume de trabalho é de 4 L com 10% de seu volume de inóculo. A temperatura para o desenvolvimento da cultura é mantida constante a 30°C e o pH ajustado manualmente a 7,0. A solução utilizada para regular o pH varia de acordo com o estudo realizado. O polipropilenoglicol é o antiespumante utilizado.

As condições iniciais de agitação e aeração são de 400 rpm e 0,4 vvm, respectivamente, e atingiram, gradualmente, 780 rpm e 4 vvm.

2.3- TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.3.1- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

2.3.1.1- Medida por espectrometria

A concentração de biomassa do material coletado é avaliada em um espectrofotômetro (modelo E225-D, marca CELM) medindo-se a absorbância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada, a faixa de absorbância utilizada foi de 0,000 até 0,800 e quando passava-se desta faixa, fazia-se diluições para manter a linearidade.

2.3.1.2- Gravimetria

A concentração celular é obtida por gravimetria a partir de um volume conhecido de cultura compreendido entre 1 e 10 mL, filtrado através de membranas Millipore de poliamida pré-pesadas (poro de 0,2 μm). O filtrado é lavado duas vezes com HCl 0,01 M, para remover íons e sais presentes na biomassa, seguido de secagem em estufa a 90°C por 24 h. A existência de uma relação linear entre a biomassa e a absorbância a 600 nm, na fase de acúmulo celular, permite construir uma curva de calibração de biomassa em função da absorbância que serve para estimar a concentração de células durante a cultura (**Anexo 1**).

2.3.2- DOSAGEM DE SUBSTRATOS

2.3.2.1- Glicose e açúcar invertido

A dosagem de glicose e açúcar invertido é feita pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores. O reativo é preparado da seguinte forma:

- 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 16 g de NaOH dissolvido em água destilada.
- Adicionar aos poucos 10 g de ácido dinitrosalicílico (aquecer se necessário).
- Completar volume a 1 litro de água destilada.

Um volume de 200 μL de sobrenadante, previamente diluído, é adicionado a 200 μL de reativo DNS e depois colocado em ebulição, durante 5 minutos, em banho-maria. Após o resfriamento em banho de gelo, adiciona-se 2 mL de água destilada. Um tempo de 15 minutos é necessário para que a amostra se estabilize à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica é realizada a 540 nm contra um branco de água destilada. A curva de calibração expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) vs. absorbância (540 nm) em uma escala compreendida entre 0 e 2 g.L^{-1} de glicose. Um exemplo de curva de calibração é apresentada no **Anexo 2**.

2.3.2.2- Proteínas

Amostras do meio de cultura compreendido entre 2 e 4 mL são centrifugadas a 15000 rpm por 5 minutos. Após ser separado do sobrenadante, o precipitado é lavado duas vezes com água destilada sendo que, depois de cada lavagem, este é centrifugado durante 2 minutos a 15000 rpm. O precipitado é ressuspendido em 2 mL de água destilada, recolhido em um tubo de ensaio e congelado a -20°C para posterior análise pelo método de Biureto (Stickland, 1951). Para esta análise, o precipitado ressuspendido tem seu volume completado para 5,5 mL de água destilada e a lise celular é provocada por adição de 1 mL de NaOH 20% (p/v) e incubação em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Após resfriamento, 170 μL de CuSO_4 25% (p/v) é adicionado e deixado em repouso por mais 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, é analisado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm. A concentração em g.L^{-1} é obtida através de uma curva de calibração de proteína (g.L^{-1}) vs absorbância (560 nm), utilizando albumina bovina (BSA) entre 0 e 3 g.L^{-1} . Um exemplo de curva de calibração é apresentada no Anexo 3.

2.3.2.3- Dosagem de P(3HB)

O P(3HB) é dosado por cromatografia gasosa conforme o método de metanólise baseado em Braunegg et al. (1978), com as modificações propostas por Brandl et al. (1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, são centrifugadas a 15000 rpm por 5 minutos para a análise de P(3HB). O precipitado é lavado duas vezes com água destilada e a última ressusensão é realizada em 2 mL de metanol acidificado, contendo ácido benzóico 0,4 g.L^{-1} como padrão interno, e congelado a -20°C para posterior análise. Após descongelamento, um volume de 2 mL de clorofórmio é adicionado e a mistura aquecida a 100°C durante 140 minutos. Depois de 1 hora de aquecimento, a mistura é agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente, adiciona-se 1 mL de água

destilada e as amostras são agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) é retirada com uma seringa e guarda-se em geladeira para posterior análise em cromatografia gasosa.

A curva de calibração é feita utilizando o poli- β -hidroxibutirato (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g e 0,010 g. Submete-se os padrões à mesma metanólise que as amostras. Um exemplo de curva de calibração é apresentada no **Anexo 4**.

A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) é de sílica fundida (\varnothing 0,53 mm X 30 m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo é um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado é o nitrogênio a 20 mL.min⁻¹ e as temperaturas de injeção, detecção e coluna são respectivamente de 185°C, 230°C e 110°C. O volume injetado é de 1 μ L. A integração e os cromatogramas (**Anexo 5**) foram obtidos através de uma placa interface AD/DA-MICROQUÍMICA.

2.3.2.4- Dosagem de fosfato

Para a dosagem do fosfato é utilizado um kit colorimétrico (Fosfato Doles). Os reagentes utilizados são os seguintes:

- Solução Padrão: solução aquosa contendo 5 mg.dL⁻¹ de fosfato.
- Ácido Ascórbico: frasco contendo 2 g de ácido ascórbico. Após reconstituição, tem-se uma solução 0,084 M de ácido ascórbico.
- Reagente Molibdato: solução 0,018 M de molibdato de amônio em ácido sulfúrico 1,5 M.
- Solução alcalina: solução 16 M de monoetanolamina.

Identifica-se 3 tubos de ensaio com B (branco), T (teste) e P (padrão) e procede-se conforme a sequência apresentada na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 – Sequência para a dosagem de fosfato.

	Branco	Teste	Padrão
Ácido Ascórbico	3 mL	3 mL	3 mL
Amostra	-	100 µL	-
Solução padrão	-	-	100 µL
Reagente Molibdato	1 mL	1 mL	1 mL
As proteínas se precipitam. Deixar repousar durante 1 minuto			
Solução alcalina	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

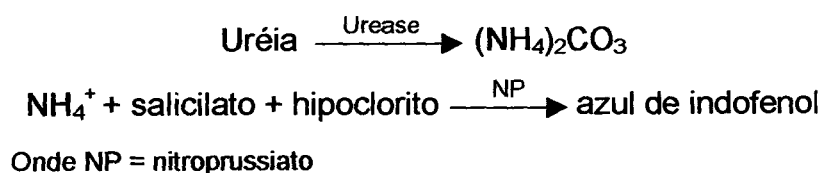
Agita-se e deixa-se repousar por 2 minutos. Lê-se as absorvâncias de teste e padrão, ajustando-se o zero com o branco, em espectrofotômetro em 660 nm.

A concentração de fosfato é calculado em g.L^{-1} pela seguinte fórmula:

$$\text{fosfato} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 0,05 (\text{g.L}^{-1})$$

2.3.2.5- Dosagem de nitrogênio

O nitrogênio determinado no meio de cultura é o nitrogênio amoniacal. A dosagem do nitrogênio amoniacal é realizada utilizando-se um kit que determina uréia por um método enzimático-colorimétrico (Uréia ES-CELM). A uréia, através da ação enzimática, é decomposta em nitrogênio amoniacal, o qual é determinado por meio colorimétrico. O fundamento do método é o seguinte:



Os reativos utilizados são os seguintes:

- 1) Reativo 1 (concentrado): tampão fosfato 0,1 M, salicilato 0,3 M, nitroprussiato de sódio 17 mM e EDTA 7 mM.
- 2) Reativo 2 (concentrado): hipoclorito de sódio 0,32 N em NaOH 4,0 M.
- 3) Enzima: solução de urease em tampão fosfato.

- 4) Padrão: solução aquosa de uréia 60 mg.dL⁻¹.
- 5) Reativo 1A: 5 partes de reativo 1 com 0,2 partes de enzima.

O procedimento adotado para a determinação do nitrogênio amoniacal é apresentado na **Tabela 2.4**.

Tabela 2.4- Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.

	Branco	Padrão	Teste
Padrão	-	10 µL	-
Amostra	-	-	10 µL
Reativo 1A	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar 5 min. a 37°C. Adicionar:			
Reativo 2	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar 5 min. a 37°C			

Ler a 600 nm, zerando o aparelho com o branco. A reação é estável por até duas horas.

O cálculo para a determinação do nitrogênio amoniacal é feito da seguinte forma:

$$[\text{NH}_4^+] = \frac{\text{absorbância teste}}{\text{absorbância padrão}} \times 0,36 (\text{g.L}^{-1})$$

2.4- ANÁLISE CINÉTICA

Como o acúmulo de P(3HB) é intracelular, as taxas específicas de crescimento celular e de produção de P(3HB) devem ser calculadas em relação à biomassa residual (X_r), obtida pela diferença entre a quantidade de biomassa total (X_t) e a quantidade de P(3HB) (X_r=X_t-P(3HB)).

2.5- TRATAMENTO DE DADOS

2.5.1- AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais obtidos são ajustados pelo programa Lissage, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoes, Arroyo, Uribe Larrea.

2.5.2- VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO

As velocidades específicas máximas de crescimento na fase de crescimento não limitado são calculadas a partir do coeficiente angular da curva do logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo.

$$\ln(X_r) = \ln(X_{r0}) + \mu t$$

X_r = biomassa residual (g)

X_{r0} = biomassa residual inicial (g)

μ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

t = tempo (h)

2.5.3- FATORES DE CONVERSÃO

O fator de conversão é obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (biomassa, biomassa residual ou P(3HB)) contra a concentração de açúcar invertido.

$$Y_{Q/S} = -\frac{dQ}{dS}$$

Onde: $Y_{Q/S}$ = fator de conversão de substrato S no componente Q ($g \cdot g^{-1}$).

Q = componente que pode representar a biomassa, biomassa residual ou P(3HB) (g).

S = substrato utilizado (g).

2.5.4-PRODUTIVIDADE MÉDIA DE P(3HB)

A produtividade média é calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB) em um instante de tempo t e a concentração inicial de P(3HB) dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$P_r = \frac{PHBt - PHBt_0}{t - t_0}$$

Onde: P_r = produtividade média de P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

PHBt = concentração de P(3HB) no instante de tempo t (g.L^{-1}).

PHBt₀ = concentração de P(3HB) no tempo t₀ inicial (g.L^{-1}).

2.5.5- PRODUTIVIDADE DE P(3HB) NA FASE DE PRODUÇÃO

A produtividade na fase de produção é calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB) em um instante de tempo t após o início da fase de produção e a concentração de P(3HB) no início da fase de produção dividida pelo intervalo de tempo correspondente a estas concentrações.

$$P_p = \frac{PHBt - PHBt_i}{t - t_i}$$

Onde: P_p = produtividade na fase de produção ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

PHBt = concentração de P(3HB) no instante de tempo t após o início da fase de produção (g.L^{-1}).

PHBt_i = concentração de P(3HB) no tempo t_i inicial da fase de produção (g.L^{-1}).

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- ESTUDOS PRELIMINARES

3.1.1- COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO EM GLICOSE E EM AÇÚCAR INVERTIDO

A glicose é o substrato normalmente utilizado como fonte de carbono para a produção de P(3HB) (Byrom, 1987). A comparação feita em frascos Erlenmeyer do crescimento de *R. eutropha* em açúcar invertido (substrato de baixo custo) e em glicose permitirá determinar a viabilidade do açúcar invertido como substrato para a produção deste biopolímero.

Como a produção de polímero se dá em duas fases, uma fase de crescimento não limitado com produção de biomassa e uma segunda fase de acúmulo de polímero, a obtenção de valores elevados de velocidade específica de crescimento causaria um aumento global da produtividade de polímero. A **Figura 3.1** mostra a evolução das concentrações de biomassa total (expressa em absorbância a 600 nm), consumo de substrato e formação de proteína para as culturas em glicose e também em açúcar invertido.

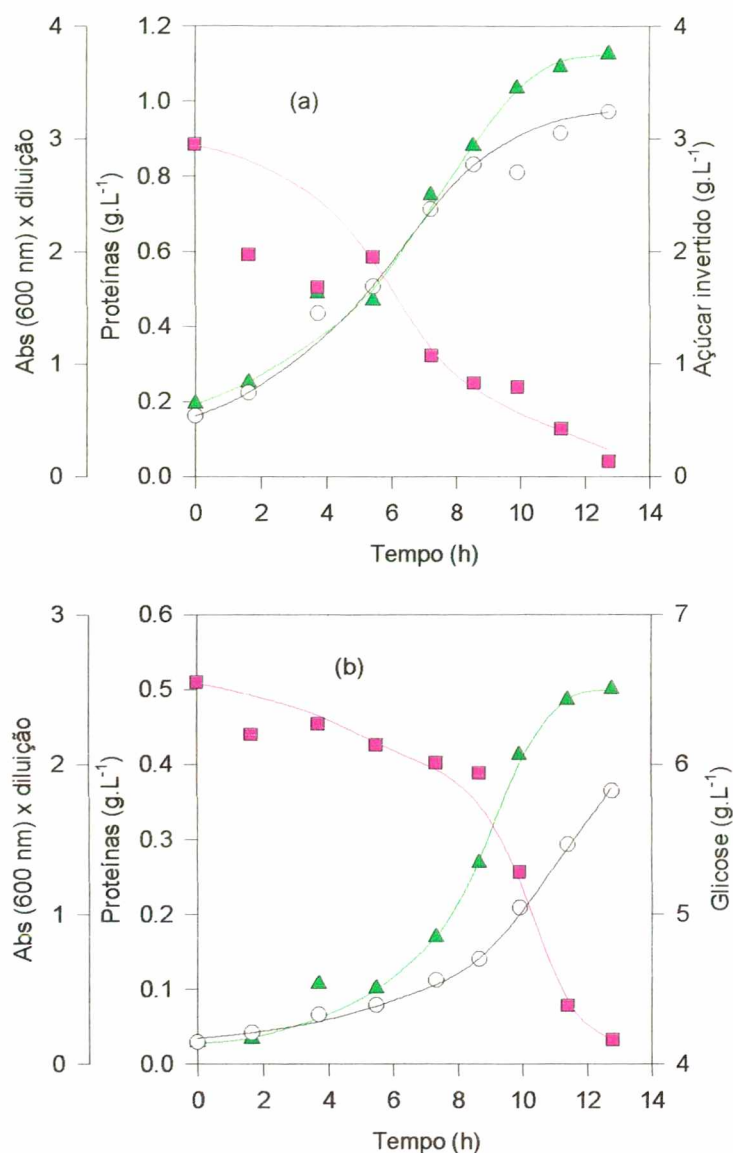


Figura 3.1- Evolução da concentração de biomassa total (expressa em absorbância a 600 nm x diluição) (O), substrato residual (■) e proteína (▲) para a cultura em açúcar invertido (a) e em glicose (b).

Como o acúmulo de P(3HB) é intracelular, a velocidade específica de crescimento é melhor representada pela evolução da biomassa residual (X_r) (item 2.4). Devido a um problema analítico, não foi possível quantificar o P(3HB) intracelular

nestas culturas. Considerando que a proporção de proteínas na biomassa residual é constante durante a fase de crescimento (Aragão, 1996) e que esta pode representar até 80% da biomassa residual (Aragão, 1996; Morinaga et al., 1978; Sonnleitner et al., 1979), utilizou-se a evolução da concentração de proteína como base para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{prot} expressa em $\text{g}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{prot}}\cdot\text{h}$).

A existência, durante a fase de crescimento celular, de uma relação linear entre a absorbância e a concentração de biomassa (**Anexo 1**) nos oferece uma outra forma de calcular a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ), que é a partir dos valores de leitura da absorbância a 600 nm da concentração de biomassa. A curva do logaritmo neperiano dos dados de absorbância, obtidos nas duas culturas, permitiu o cálculo de μ . Para glicose (**Figura 3.2**) o valor obtido foi de $0,20 \text{ h}^{-1}$ e a cultura permaneceu em fase exponencial durante o tempo estudado. No caso do açúcar invertido (**Figura 3.3**) o valor máximo obtido para a velocidade específica de crescimento celular foi de $0,21 \text{ h}^{-1}$, mas nota-se que a cultura não permaneceu em fase exponencial além de sete horas de experimento.

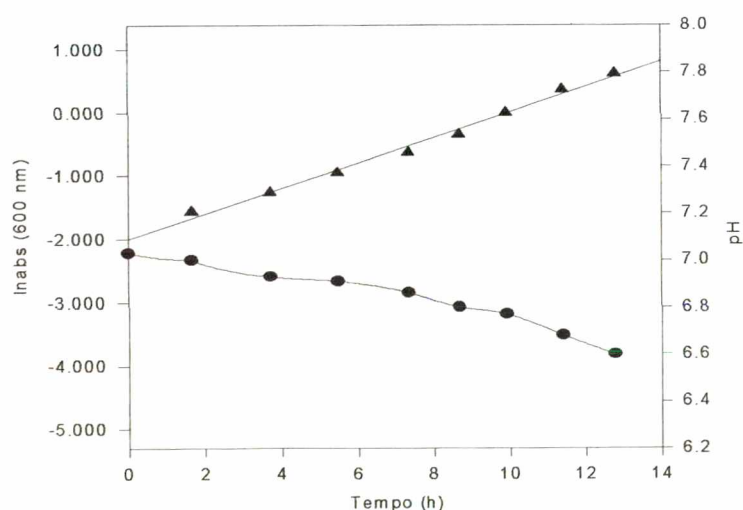


Figura 3.2- Evolução do pH (●) e curva do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm (▲) para a cultura em glicose.

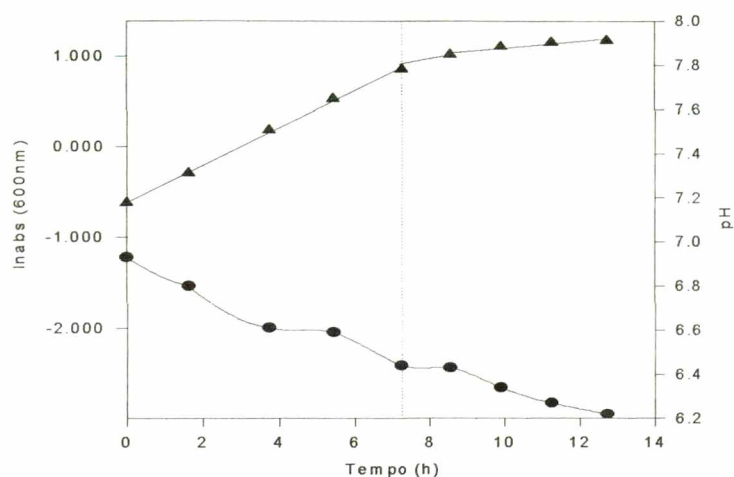


Figura 3.3- Evolução do pH (●) e curva do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm (▲) para a cultura em açúcar invertido .

As **Figuras 3.2 e 3.3** mostram ainda a evolução do pH para as duas culturas, onde se observa uma acentuada queda no valor de pH para a cultura em açúcar invertido, provavelmente devido a uma maior concentração celular. Uma hipótese levantada para a diminuição da velocidade específica seria uma inibição do crescimento para valores de pH inferiores a 6,4. A **Tabela 3.1** sintetiza os resultados obtidos das velocidades específicas.

Tabela 3.1- Velocidades específicas de crescimento celular e de formação de proteína para as culturas em glicose e em açúcar invertido.

	Concentração inicial (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μ_{prot} (g _{prot} /g _{prot} .h)
Glicose	6,5	0,20	0,29
	16,9	0,19	0,19
Açúcar Invertido	2,9	0,21	0,18
	18,8	0,20	0,20

As velocidades específicas de crescimento (μ e $\mu_{\text{prot.}}$) para o açúcar invertido foram, em alguns casos, ligeiramente superiores às aquelas obtidas para a glicose. O açúcar invertido é constituído por uma igual mistura de glicose e frutose. Segundo Gomez et al. (1996), apesar da *R. eutropha* assimilar melhor a glicose do que a frutose, a mistura de ambas parece permitir ao microrganismo consumir a frutose de forma mais eficiente do que esta isolada.

Os resultados obtidos de velocidades específicas de crescimento celular em glicose e em açúcar invertido foram bastante similares, o que demonstra que a *R. eutropha* é capaz de se desenvolver em açúcar invertido da mesma forma que em glicose e, portanto, é viável o seu uso como substrato alternativo de baixo custo.

3.1.2- CRESCIMENTO DE *R. eutropha* EM ÁCIDO LÁTICO E SUBSTRATOS MISTOS

Estudos anteriores realizados com *R. eutropha* (Aragão, 1996; Tanaka et al., 1993; Sonnleitner et al., 1979) mostraram que a velocidade específica de crescimento (μ) deste microrganismo em ácido láctico é de aproximadamente $0,4 \text{ h}^{-1}$, que corresponde a aproximadamente o dobro do μ obtido em glicose. O ácido láctico tem a vantagem, com relação aos substratos osídicos, de ser convertido, via piruvato, diretamente a acetilCoA, precursor do P(3HB) sem a necessidade de reações intermediárias. A forma como o ácido láctico é metabolizado pelo microrganismo, associado a uma velocidade específica de crescimento elevada, o torna um substrato interessante para a produção de P(3HB).

Com o objetivo de estudar o aumento da produtividade em células e conseqüente diminuição do custo de produção do polímero, foi realizado um estudo utilizando-se o ácido láctico como única fonte de carbono e também substratos mistos de ácido láctico com glicose ou açúcar invertido. As culturas foram realizadas em frascos Erlenmeyer, com uma concentração máxima de ácido láctico de 5 g.L^{-1} . Esta concentração foi baseada no trabalho de Tanaka et al. (1993) que observaram um efeito inibidor no crescimento de *R. eutropha* para concentrações superiores a 10 g.L^{-1} de lactato e uma velocidade específica máxima de crescimento para uma concentração

de 5 g.L^{-1} . O logaritmo neperiano dos dados de absorbância e de proteínas das culturas realizadas em ácido láctico, ácido láctico mais açúcar invertido e ácido láctico mais glicose são apresentados nas **Figuras 3.4, 3.5 e 3.6**, respectivamente.

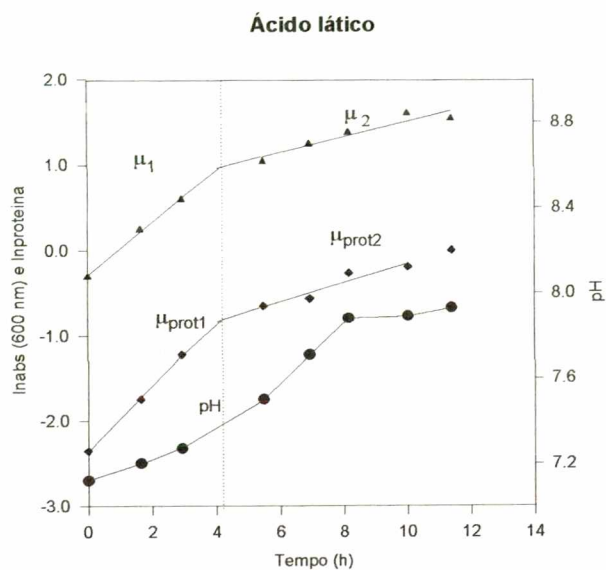


Figura 3.4- Evolução do pH (●) e curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm (▲) e da proteína (◆) para a cultura em ácido láctico.

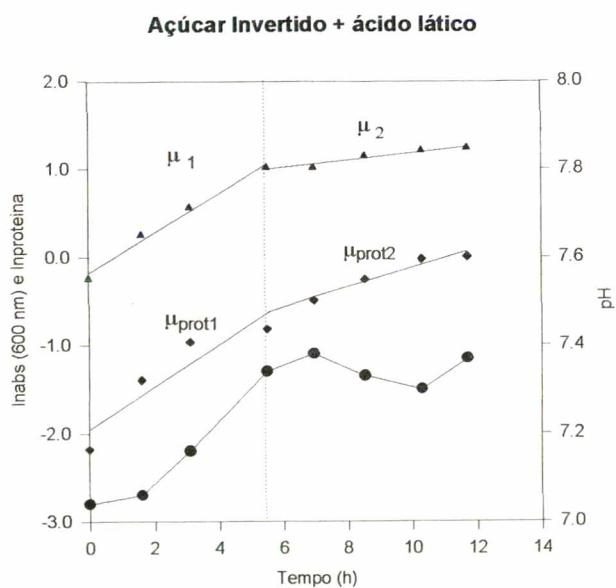


Figura 3.5- Evolução do pH (●) e curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm (▲) e da proteína (◆) para a cultura em açúcar invertido + ácido láctico.

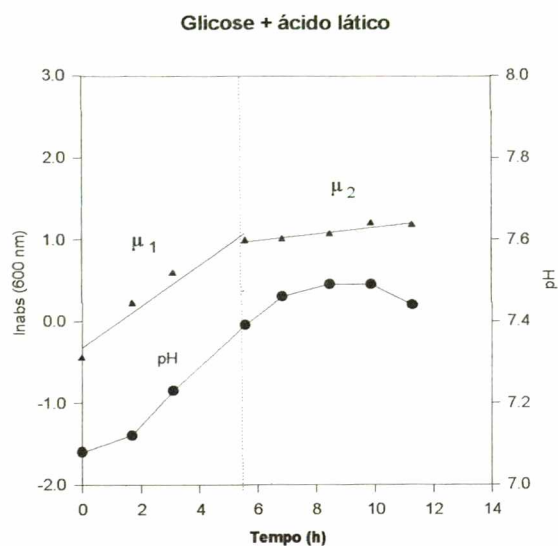


Figura 3.6- Evolução do pH (●) e curva do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm (▲) para a cultura em glicose + ácido láctico.

Observa-se duas fases distintas de crescimento com uma velocidade específica mais elevada no começo da cultura e sua diminuição na fase final. A **Tabela 3.2** apresenta os valores de velocidades específicas obtidas em ácido láctico e em culturas mistas nestas fases. As velocidades específicas de crescimento celular em ácido láctico e culturas mistas na primeira fase (μ_1) (**Tabela 3.2**) foram superiores àquelas obtidas em glicose e açúcar invertido (**Tabela 3.1**). Na segunda fase das culturas com ácido láctico, a queda nas velocidades específicas de crescimento celular foram significativas (μ_2). Uma hipótese para isto, seria o fato de que o aumento de pH para valores acima de 7,3 teria um efeito inibidor sobre o crescimento de *R. eutropha*.

Tabela 3.2- Velocidades específicas de crescimento celular para as culturas em ácido láctico sozinho e combinado com glicose ou açúcar invertido.

	Concentração inicial (g.L ⁻¹)	μ_1	μ_2	μ_{prot1}	μ_{prot2}
Ácido láctico	5	0,31	0,09	0,38	0,11
Glicose + ácido láctico	2,5+2,5	0,34	0,03	—	—
Aç. inv. + ácido láctico	1,5+2,5	0,23	0,04	0,24	0,11

As **Figuras 3.7** e **3.8**, mostram a evolução do pH e o consumo de açúcar invertido e glicose nas culturas mistas. Observa-se que a partir de duas horas de cultura o pH começa a subir, indicando o consumo de ácido láctico. Nota-se que este consumo é concomitante ao consumo de açúcar invertido (**Figura 3.7**) e glicose (**Figura 3.8**), cujas concentrações diminuem desde o início dos experimentos. Comparando-se os valores obtidos de velocidade específica nas culturas mistas com o valor de velocidade específica em ácido láctico, verifica-se que o consumo de ácido láctico junto com outros substratos (glicose e açúcar invertido) não apresentou qualquer efeito sinérgico, ou seja, a velocidade específica do microrganismo não foi potencializada.

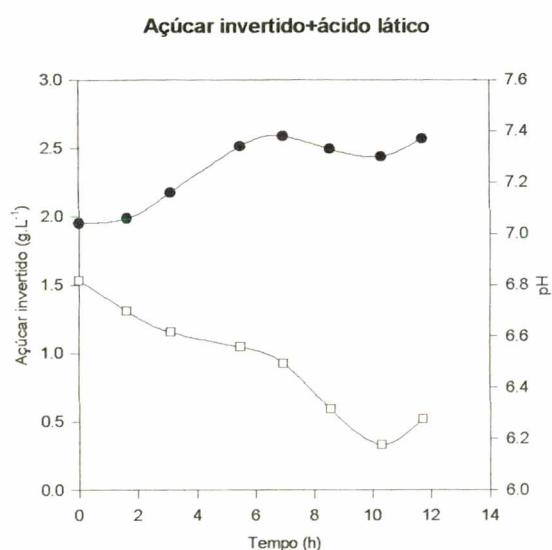


Figura 3.7- Evolução do pH (●) e do consumo de açúcar invertido (□) ao longo do tempo para a cultura mista açúcar invertido + ácido láctico.

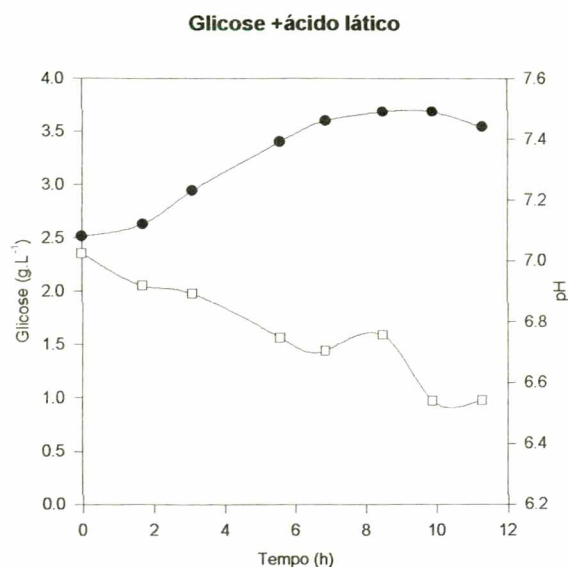


Figura 3.8- Evolução do pH (●) e do consumo de glicose (□) ao longo do tempo para a cultura mista glicose + ácido láctico.

Os experimentos em frascos agitados indicaram ser interessante desenvolver maiores estudos com o ácido láctico, visto que os valores de velocidade específica de crescimento obtidos foram bem elevados. Entretanto, o crescimento do microrganismo neste substrato requer um controle muito mais preciso da concentração de ácido láctico no meio pelo efeito inibidor que pode causar ao crescimento do microrganismo para concentrações maiores que 10 g.L⁻¹ (Tanaka et al., 1993).

A utilização do açúcar invertido para os estudos em biorreator, parece ser a melhor escolha, já que o açúcar invertido é um substrato barato, a velocidade específica de crescimento celular foi similar a da glicose e o crescimento da *R. eutropha* neste substrato é mais fácil de controlar do que em ácido láctico.

3.1.3- ESTUDO PRELIMINAR COM AÇÚCAR INVERTIDO COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE P(3HB) EM BIORREATOR

O estudo preliminar com o açúcar invertido em biorreator foi realizado com o objetivo de determinar a faixa mínima de concentração de substrato em que se deve trabalhar. Em estudos realizados no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, 1993) foi verificado que concentrações de açúcares redutores superiores a 40 g.L^{-1} causavam inibição no crescimento celular, tornando-se necessário realizar alimentações de substrato de forma que a concentração permaneça entre 30 e 35 g.L^{-1} . Por outro lado, também é importante saber qual a concentração mínima de substrato que o microrganismo não consegue mais assimilar e assim determinar o momento em que é necessário uma nova alimentação da fonte de carbono.

A cultura, no presente trabalho, foi desenvolvida em batelada com uma concentração inicial de 30 g.L^{-1} de açúcar invertido e sob carência em nitrogênio, após a fase de acúmulo de biomassa, para favorecer a produção de P(3HB). A **Figura 3.9** apresenta a evolução das concentrações de biomassa total, proteína, P(3HB) e açúcar invertido ao longo do tempo.

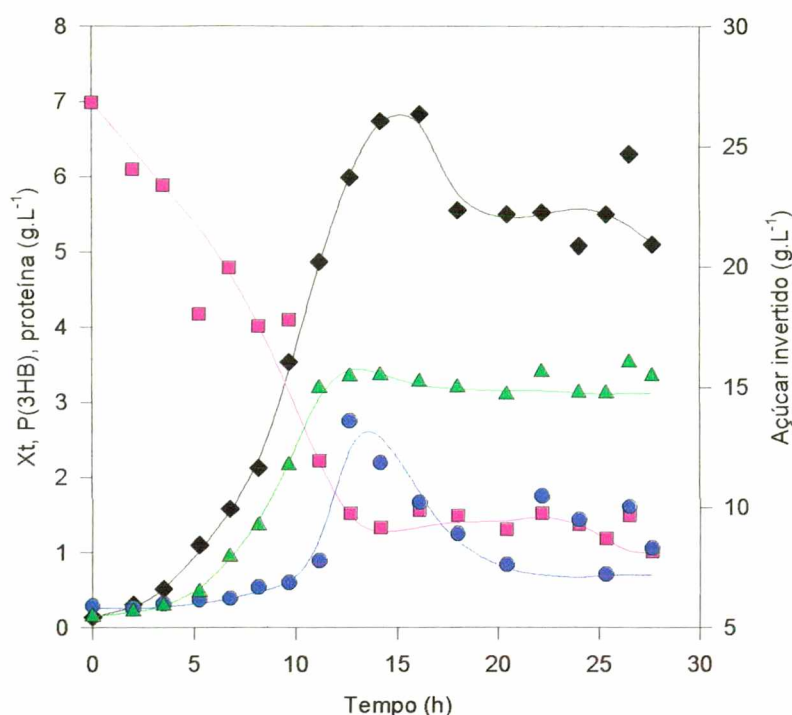


Figura 3.9- Evolução das concentrações de biomassa total (X_t ; ◆), P(3HB) (●), proteína (▲) e açúcar invertido (■) em função do tempo.

Observa-se que até 11 horas de cultura há um aumento exponencial na concentração de biomassa e de proteína enquanto que a produção de P(3HB) é pequena. Como a proteína representa um percentual importante da biomassa residual, pode-se afirmar que neste período o crescimento celular se deve principalmente à formação de biomassa residual. Durante esta fase, o fator de conversão de açúcar invertido em biomassa total foi de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$ (**Anexo 6**), próximo ao apresentado por Kim et al. (1994) que, trabalhando com *R. eutropha* em batelada alimentada de glicose, obtiveram um fator de conversão de glicose em biomassa total de $0,48 \text{ g.g}^{-1}$.

Após 11 horas de cultura, a concentração de proteína começou a se estabilizar e o aumento da concentração celular passou a resultar do P(3HB) acumulado pelas células. No entanto, após 14 horas de cultura, a concentração de açúcar invertido atingiu valores próximos de 10 g.L^{-1} e o microrganismo parece não conseguir mais assimilar adequadamente o substrato sofrendo, deste modo, uma indesejada limitação pela fonte de carbono. Como pode ser observado na **Figura 3.9**, esta limitação fez com

que as células consumissem o P(3HB) intracelular provocando a diminuição da concentração do polímero. Belfares et al. (1995) observaram comportamento similar para culturas de *R. eutropha* em glicose onde, para evitar uma limitação pelo substrato, foi necessário uma concentração de, no mínimo, 10 g.L⁻¹.

O estudo preliminar em biorreator permitiu concluir que, para se evitar a inibição ou limitação do substrato, há a necessidade de se fazer um pulso de alimentação de açúcar invertido que garanta uma concentração de substrato em uma faixa de no mínimo 10 g.L⁻¹ e, conforme os estudos do IPT (1993), no máximo 40 g.L⁻¹.

3.2- CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE P(3HB) EM AÇÚCAR INVERTIDO: NITROGÊNIO OU FÓSFORO COMO NUTRIENTES LIMITANTES

Após a fase inicial de produção de biomassa, o acúmulo de P(3HB) é favorecido pela limitação de um elemento nutritivo como oxigênio, magnésio, potássio, enxofre, nitrogênio ou fósforo (Schlegel et al., 1961; Dawes e Senior, 1973; Oeding et al., 1973; Daniel et al., 1992; Asenjo et al., 1995; Kim et al., 1996). No presente trabalho, realizou-se um estudo comparativo da produção de P(3HB) em culturas sob carência e limitação de nitrogênio e de fósforo, utilizando-se o açúcar invertido como fonte de carbono.

O nitrogênio foi escolhido pois o crescimento da biomassa é mais dependente deste elemento, já que 95% do nitrogênio metabolizado é utilizado na síntese de proteínas (Repaske e Repaske, 1976). Como as proteínas representam até 80% da biomassa residual, o nitrogênio é facilmente consumido, o que facilita o controle do crescimento limitado.

No caso do fósforo, a sua escolha está relacionada ao fato de não fazer parte da composição das proteínas e com isto, espera-se obter um crescimento residual sem alterar diretamente a capacidade de biossíntese das proteínas. Cabe ressaltar que a produção industrial deste polímero é realizada por limitação em fósforo (Luzier, 1992) e também que o melhor resultado de produtividade de P(3HB) em cultura de *R. eutropha*, até agora relatado, foi conseguido sob limitação em fosfato (Ryu et al., 1997). A comparação da produção de P(3HB) sob a influência do nitrogênio ou do fósforo como

elementos limitantes pode fornecer dados importantes para a melhoria do processo produtivo, considerando-se o substrato em questão.

Nos experimentos realizados, dividiu-se a produção de P(3HB) em duas fases: na primeira fase, em condições de crescimento balanceado, há produção de biomassa e o acúmulo de P(3HB) é pequeno. Na segunda fase, após o esgotamento do nutriente limitante e com excesso da fonte de carbono, o acúmulo de P(3HB) no interior das células predomina. Para as culturas em carência de nitrogênio ou fósforo, houve o esgotamento do nutriente limitante sem que houvesse posterior alimentação deste. No caso dos experimentos em limitação de fósforo ou nitrogênio, houve uma alimentação desses nutrientes feita de forma a garantir um crescimento residual controlado.

3.2.1- PRODUÇÃO DE P(3HB) SOB CARÊNCIA E LIMITAÇÃO EM NITROGÊNIO

A primeira etapa do trabalho foi a comparação da produção de P(3HB) sob carência de nitrogênio (cultura A) e sob alimentação controlada em nitrogênio, permitindo a limitação do crescimento com manutenção da atividade celular (cultura B).

As culturas foram realizadas em fermentador de 5 L em meio mineral (MM) modificado (**item 2.1**). O KH_2PO_4 da pré-cultura foi substituído por H_3PO_4 $1,08 \text{ g.L}^{-1}$, para evitar o acúmulo de íons potássio. A concentração inicial de sulfato de amônia foi alterada de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ para $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ (equivalente a $0,483 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio), o que permite o esgotamento do nitrogênio após uma fase de crescimento não limitado com produção de aproximadamente $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, baseado em Aragão (1996).

A alimentação controlada de nitrogênio para a cultura B, foi realizada de forma a manter um crescimento celular constante de $0,8 \text{ g.h}^{-1}$ de biomassa para uma vazão de alimentação constante de $0,108 \text{ g.h}^{-1}$ de nitrogênio, considerando-se o fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual ($Y_{X/N}$) igual a $7,3 \text{ g.g}^{-1}$ (Aragão, 1996). O controle do pH das culturas foi feito por uma solução de KOH 5 M e uma solução de H_3PO_4 1 M.

A concentração inicial de açúcar invertido para ambas as culturas foi de aproximadamente 30 g.L^{-1} . A fim de evitar uma limitação da fonte de carbono, as culturas A e B foram alimentadas com um pulso de solução concentrada de 800 g.L^{-1}

de açúcar invertido quando a concentração residual deste substrato no meio apresentou-se em torno de 10 g.L^{-1} , de forma a manter a concentração de açúcar invertido entre 10 e 40 g.L^{-1} , conforme **item 3.1.3**. Para determinar o momento ideal de alimentação do açúcar invertido, foi realizada a dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS (**item 2.3.2.1**).

3.2.1.1- Características gerais das fases de crescimento e de produção

A **Figura 3.10** mostra a evolução das diferentes quantidades de biomassa total, biomassa residual, proteína, P(3HB), açúcar invertido, nitrogênio e a concentração de açúcar invertido com o tempo para a cultura A. A evolução da cultura foi apresentada em massa (g) a fim de eliminar a variação de concentração resultante do efeito da diluição ao se adicionar o açúcar invertido. A concentração de açúcar invertido, apresentada em g.L^{-1} , mostra o momento de sua alimentação e a faixa em que a concentração deste variou, aproximadamente, entre 15 e 40 g.L^{-1} . A limitação de nitrogênio foi determinada pela queda abrupta do nitrogênio amoniacal no meio.

Analisando-se a curva de P(3HB) da **Figura 3.10**, observa-se duas fases características: a primeira é uma fase não limitada em que a quantidade de P(3HB) produzido é praticamente desprezível e há acúmulo de biomassa. Na outra fase, observa-se a produção de P(3HB) após o esgotamento de nitrogênio (indicada pela linha pontilhada). Na fase de crescimento não limitado (primeira fase), o aumento da massa celular resulta, quase totalmente, do aumento de biomassa residual. O acúmulo de P(3HB) intracelular iniciou-se antes do esgotamento de nitrogênio no meio, indicando que baixas concentrações de nitrogênio já são limitantes o suficiente para iniciar o processo. No momento que se esgota o nitrogênio, o acúmulo de P(3HB) passa a ser mais acentuado enquanto que a quantidade de biomassa residual se estabiliza. Percebe-se também que a velocidade de formação de proteína começa a diminuir, no final da fase de crescimento, tendendo a uma estabilização. A quantidade de P(3HB) aumentou aproximadamente 5 vezes a partir do início da fase de produção enquanto que a biomassa residual quase não se alterou neste mesmo período.

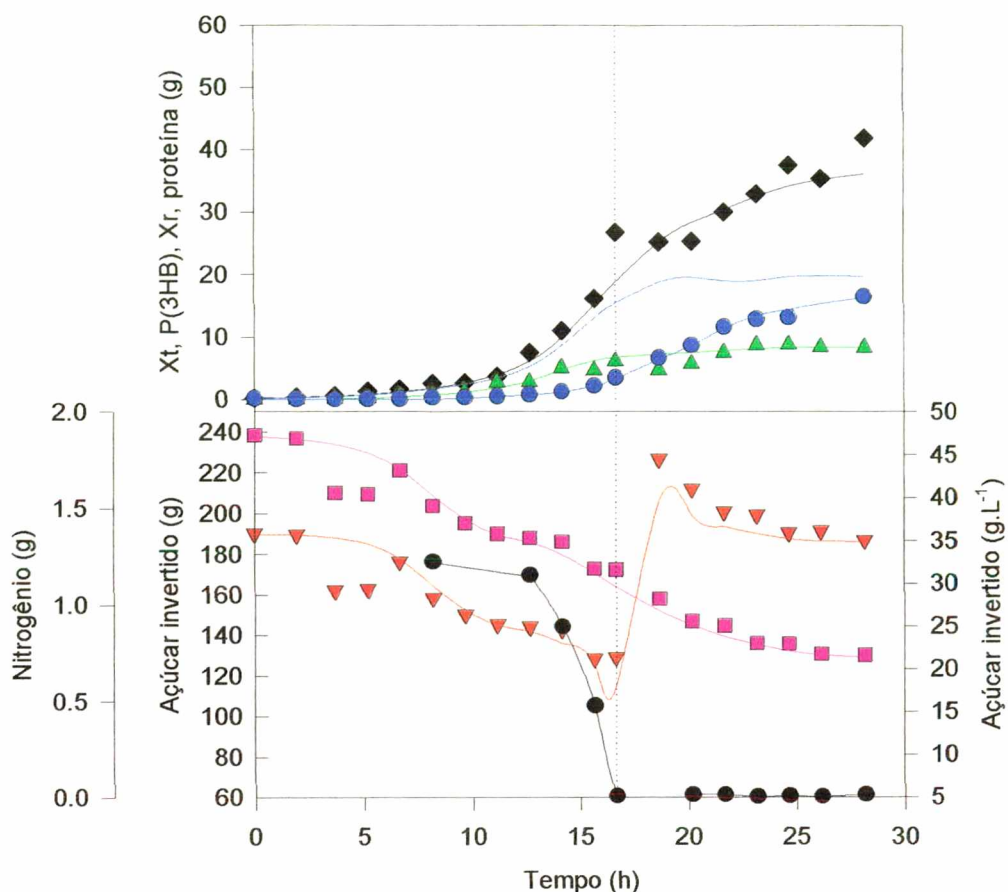


Figura 3.10- Evolução das quantidades de biomassa total (X_t ; \blacklozenge), P(3HB) (\bullet), biomassa residual (X_r ; —), proteína (\blacktriangle), açúcar invertido (\blacksquare), nitrogênio () e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) (\blacktriangledown) em função do tempo para a cultura sob carência em nitrogênio. A linha pontilhada indica o esgotamento do nitrogênio.

A **Figura 3.11** apresenta a evolução das diferentes quantidades de biomassa total, biomassa residual, proteína, P(3HB), açúcar invertido, nitrogênio e a concentração de açúcar invertido com o tempo para a cultura B. A diminuição repentina de nitrogênio amoniacal no meio, indicou o momento da alimentação controlada de nitrogênio neste experimento.

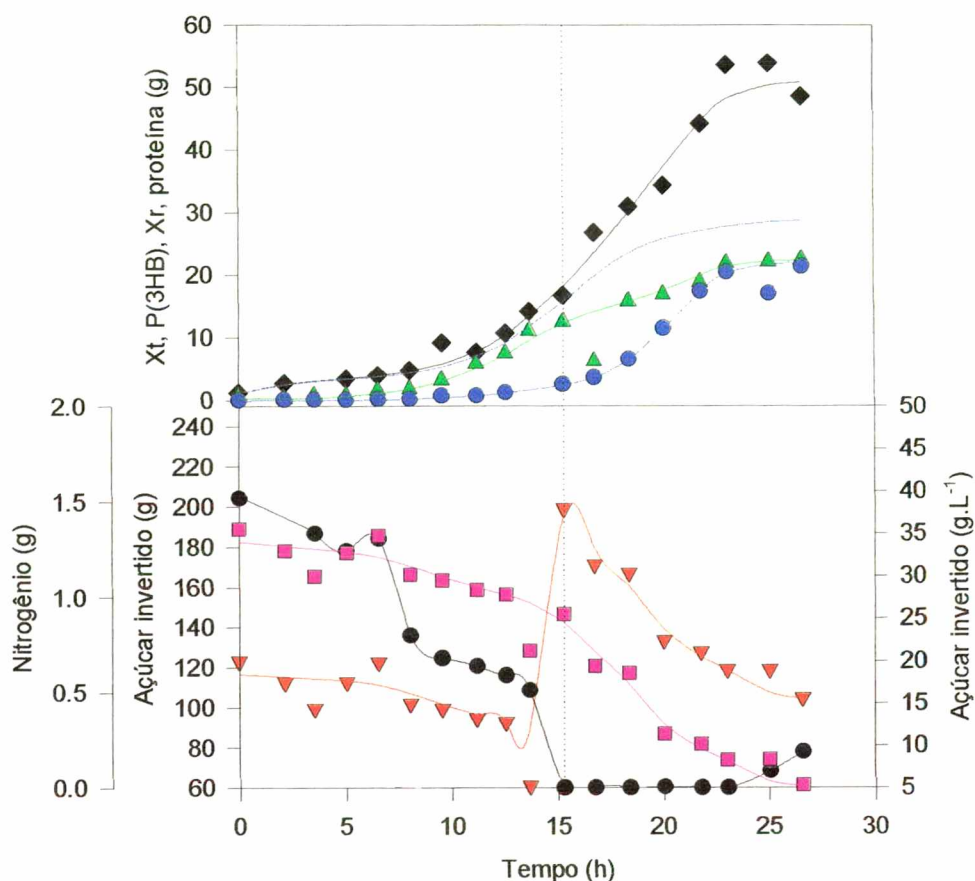


Figura 3.11- Evolução das quantidades de biomassa total (Xt; \blacklozenge), P(3HB) (●), biomassa residual (Xr; —), proteína (▲), açúcar invertido (■), nitrogênio (●) e concentração de açúcar invertido (g.L⁻¹) (▼) em função do tempo para a cultura sob limitação em nitrogênio. A linha pontilhada indica o esgotamento do nitrogênio.

A cultura alimentada em nitrogênio, da mesma forma que a cultura anterior, também possui duas fases distintas e baixas concentrações de nitrogênio já foram limitantes o suficiente para iniciar o acúmulo de P(3HB), antes de iniciar a sua alimentação constante. No início da fase de produção de P(3HB), observou-se um aumento exponencial do biopolímero para um aumento linear de proteína. Ao final desta fase, mesmo com a alimentação constante de nitrogênio, houve uma interrupção na produção de P(3HB) e na formação de proteína, ou seja, não houve mais acúmulo

de biopolímero e crescimento celular. O aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no final da cultura serviu para indicar a exaustão das células. Entre as hipóteses para o ocorrido está uma provável limitação de oxigênio visto que a falta de uma sonda não permitiu controlar o oxigênio dissolvido no meio. Outra hipótese relevante é que, se for mantida uma velocidade de crescimento celular constante, o aumento da massa celular provoca uma diminuição na velocidade específica de crescimento celular que pode atingir valores que comprometem o metabolismo microbiano. Aragão (1996), observou que para valores de μ abaixo de $0,008 \text{ h}^{-1}$ fica comprometida a manutenção da atividade protéica e a produção de P(3HB), havendo uma queda na velocidade específica máxima de produção de P(3HB).

A **Tabela 3.3** apresenta os fatores de conversão de substrato em biomassa total, biomassa residual e P(3HB) obtidos a partir do coeficiente angular do gráfico destes em função do açúcar invertido (**Anexos 7, 8, 9 e 10**). Os valores de conversão são quase os mesmos para as duas culturas com uma pequena superioridade para a cultura A. Analisando-se os fatores de conversão, confirma-se que, durante a fase de crescimento, a biomassa total é representada pela biomassa residual e na fase de produção a predominância é de P(3HB) na biomassa total. Os valores do fator de conversão para o P(3HB) na fase de produção para as culturas A e B foram ligeiramente superiores aos valores de $0,30 \text{ g.g}^{-1}$ que Kim et al.(1994) e IPT (1993) obtiveram, respectivamente, para glicose e melaço de cana invertido, sob carência em nitrogênio.

Tabela 3.3- Fatores de conversão de açúcar invertido em biomassa total, biomassa residual e P(3HB) nas fases de crescimento e produção para as culturas A e B.

Fatores de conversão (g.g^{-1})	Cultura	Fase de crescimento	Fase de produção
$Y_{Xt/S}$	A	0,60	0,48
	B	0,56	0,44
$Y_{Xr/S}$	A	0,51	0,10
	B	0,47	0,10
$Y_{P(3HB)/S}$	A	0,09	0,38
	B	0,09	0,34

O valor da produtividade média de P(3HB) obtido para a cultura alimentada em nitrogênio (cultura B) foi superior àquele obtido em carência de nitrogênio (cultura A) (**Figura 3.12**). Durante a fase de produção, obteve-se uma produtividade média máxima para a cultura A de $0,16 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que para a cultura B o resultado foi de $0,23 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Uma hipótese para a obtenção de uma produtividade superior para a cultura B pode estar na manutenção da atividade celular, indicada pela produção de proteína (**Figura 3.11**), enquanto que, na cultura sob carência ocorre a estabilização desta produção após o esgotamento de nitrogênio (**Figura 3.10**). Este fato indica a importância da manutenção da atividade metabólica para a produção do biopolímero.

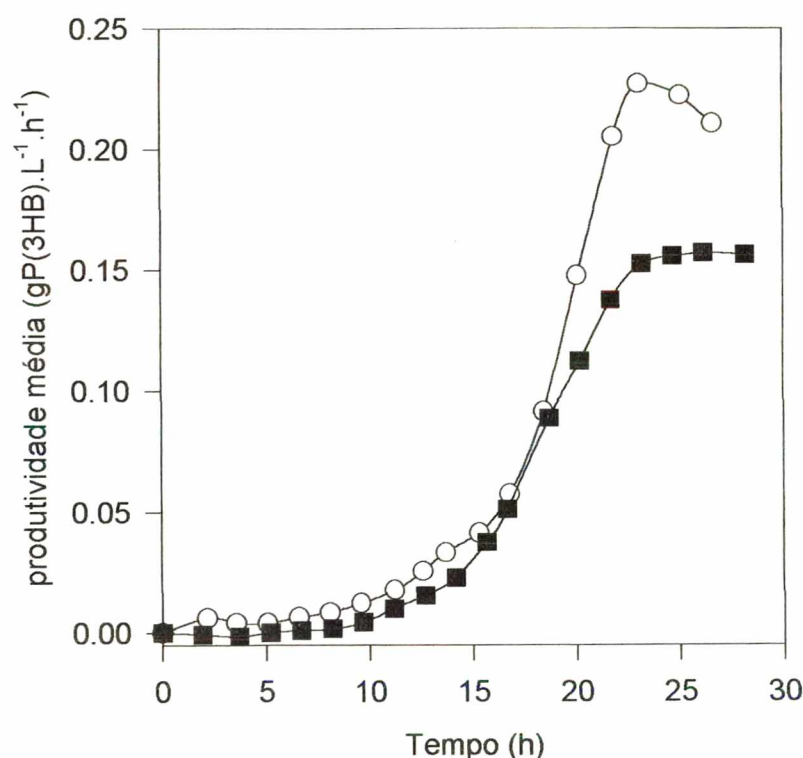


Figura 3.12- Evolução das produtividades médias, expressas em $\text{gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para as culturas sob carência (■) e limitada em nitrogênio(O).

A velocidade específica máxima de crescimento celular, calculada pela equação $\ln(X_r) = \ln(X_{r0}) + \mu_{\max}t$, foi igual a $0,26 \text{ h}^{-1}$ para ambas as culturas (**Figura 3.13**). Estes resultados são próximos aos obtidos em outros trabalhos que usaram açúcares redutores. Bitar e Underhill (1990) obtiveram um μ_{\max} de $0,26 \text{ h}^{-1}$ usando glicose como substrato e estudos desenvolvidos no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, 1993) usando sacarose invertida, resultaram em um μ_{\max} em torno de $0,20 \text{ h}^{-1}$.

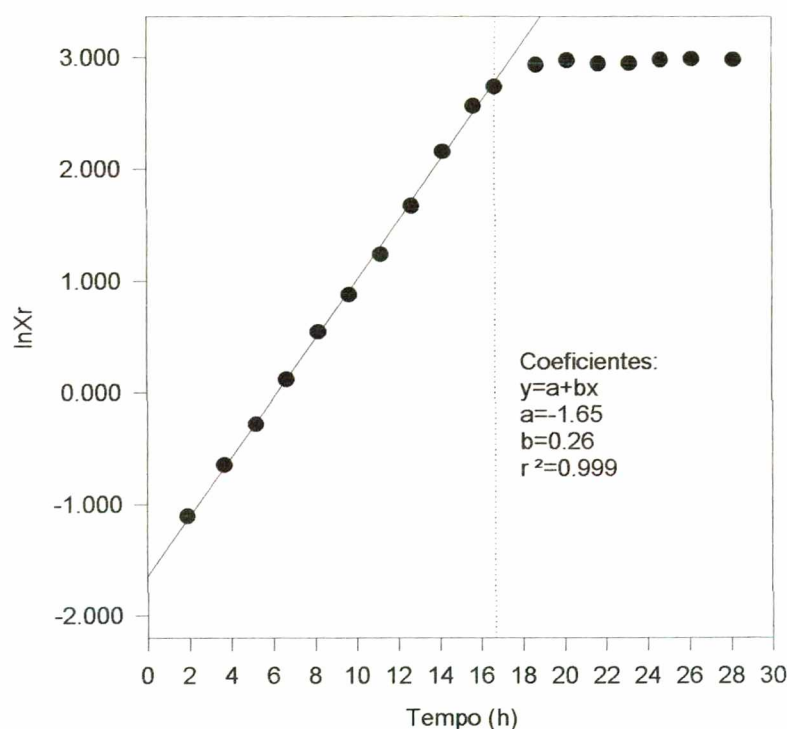


Figura 3.13- Curva do logaritmo neperiano da biomassa residual para a cultura sob carência em nitrogênio.

Durante a fase de produção, a cultura alimentada em nitrogênio apresentou uma velocidade específica máxima de produção de P(3HB) (q_{PHB}) por volta de $0,14 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que na cultura em carência a velocidade específica máxima foi de $0,08 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Figura 3.14**). As velocidades específicas de produção de P(3HB) foram calculadas através do programa *Lissage* (item 2.5.1).

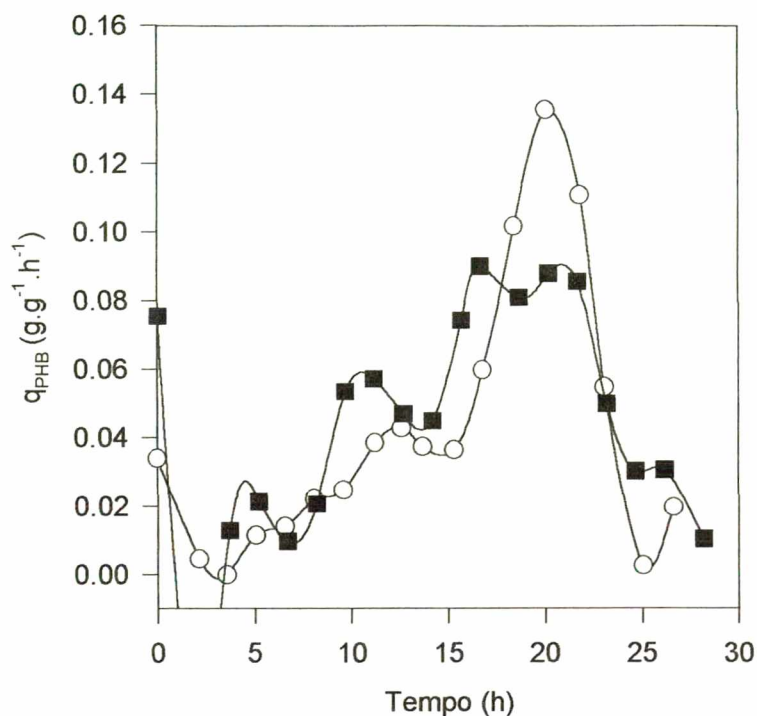


Figura 3.14- Evolução das velocidades específicas de produção de P(3HB) com relação ao tempo para as culturas sob carência (■) e limitação em nitrogênio(O).

Aragão (1996) observou a manutenção da velocidade específica máxima de produção de P(3HB) na fase de produção, quando da alimentação de nitrogênio. Entretanto, no presente experimento, a velocidade específica máxima de produção de P(3HB) caiu logo após ter atingido o seu valor máximo. Uma hipótese para a diminuição desta velocidade seria a possível limitação de oxigênio dissolvido no meio que, neste caso, não foi controlado e sabe-se que este deve ser mantido acima de 20% da saturação, utilizando-se ar.

Cabe ressaltar que a cultura alimentada em nitrogênio teve seu pH controlado de forma manual, sem o auxílio de uma sonda, o que dificultou a manutenção de seu valor em torno de 7,0. Já na cultura sob carência em nitrogênio, foi possível manter o pH em torno de 7,0 pois havia uma sonda para garantir esta medição (**Figura 3.15**).

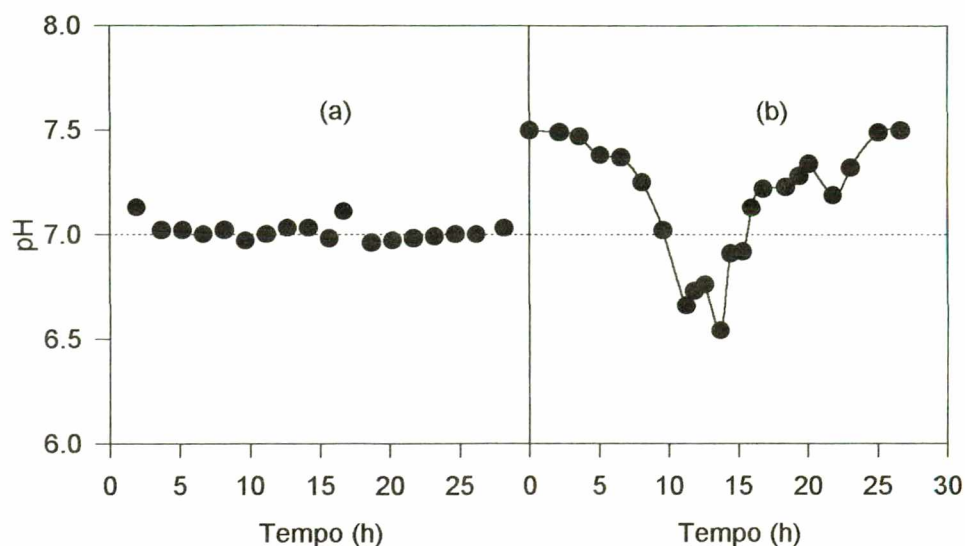


Figura 3.15- Evolução do pH ao longo do tempo para as culturas em carência (a) e limitação em nitrogênio (b).

3.2.1.2- Conclusão

A alimentação controlada de nitrogênio durante a fase de produção permitiu obter uma produtividade de P(3HB) mais elevada do que aquela obtida para a cultura sob carência em nitrogênio. Acredita-se que a manutenção de um crescimento residual com uma atividade protéica seja favorável à produção de P(3HB), permitindo altos valores de produtividade e velocidade específica de formação de P(3HB).

Os resultados obtidos mostram que é possível otimizar a produção de P(3HB) a partir da escolha de um elemento limitante capaz de garantir um crescimento celular residual com síntese de proteínas. O fósforo, por não fazer parte da composição de proteínas e não interferir diretamente em sua síntese, é um exemplo de elemento a ser estudado. Além disso, adotando o fósforo como elemento limitante, torna-se possível controlar o pH com uma solução de NH_4OH que pode também servir como fonte de nitrogênio para *R. eutropha*.

3.2.2 – PRODUÇÃO DE P(3HB) SOB CARÊNCIA E LIMITAÇÃO EM FÓSFORO

As culturas foram realizadas em fermentador de 5 L em meio mineral (MM) modificado (**item 2.1**). As concentrações de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e de KH_2PO_4 foram diminuídas respectivamente para 0,9 e 0,15 g.L^{-1} para garantir o esgotamento de fósforo após a produção de aproximadamente 10 g.L^{-1} de biomassa, baseado em um rendimento de fósforo em biomassa de 103 g.g^{-1} (Aragão, 1996). A concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi a mesma que aquela utilizada durante a pré-cultura (5,0 g.L^{-1}) e o pH do meio durante a cultura foi ajustado com uma solução de NH_4OH 14% para evitar limitação em nitrogênio.

A concentração inicial de açúcar invertido para a cultura sob carência em fósforo (cultura C) e sob alimentação controlada de fósforo (cultura D) ficou em torno de 30 g.L^{-1} , havendo posterior alimentação deste substrato com o mesmo objetivo e da mesma forma com que foi feito para as culturas em nitrogênio (**item 3.2.1**). Realizou-se a dosagem do substrato pelo método do DNS (**item 2.3.2.1**) durante as culturas para determinar o momento da alimentação. O controle do fósforo consumido foi feito por intermédio de um kit específico de fosfato (**item 2.3.2.4**) e por isso o consumo foi expresso em termos de fosfato.

3.2.2.1-*Características gerais das fases de crescimento e de produção*

A **Figura 3.16** mostra a evolução das diferentes quantidades de biomassa total, biomassa residual, proteína, P(3HB), açúcar invertido, fosfato e a concentração de açúcar invertido com o tempo para a cultura C. A evolução da cultura foi apresentada em massa (g) a fim de eliminar a variação de concentração resultante do efeito da diluição ao adicionar o açúcar invertido. A evolução da concentração de açúcar invertido, apresentada em g.L^{-1} , mostra o momento de sua alimentação e a faixa em que a concentração deste variou (aproximadamente entre 12 e 42 g.L^{-1}).

Analisando-se a **Figura 3.16**, observa-se que, na fase de crescimento, há um aumento exponencial da biomassa total relacionada praticamente ao aumento da biomassa residual. A partir de 11 horas de cultura, verifica-se um aumento exponencial

na produção de P(3HB), quando a quantidade residual de fosfato no meio era de 0,39 g, correspondente a $0,11 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato.

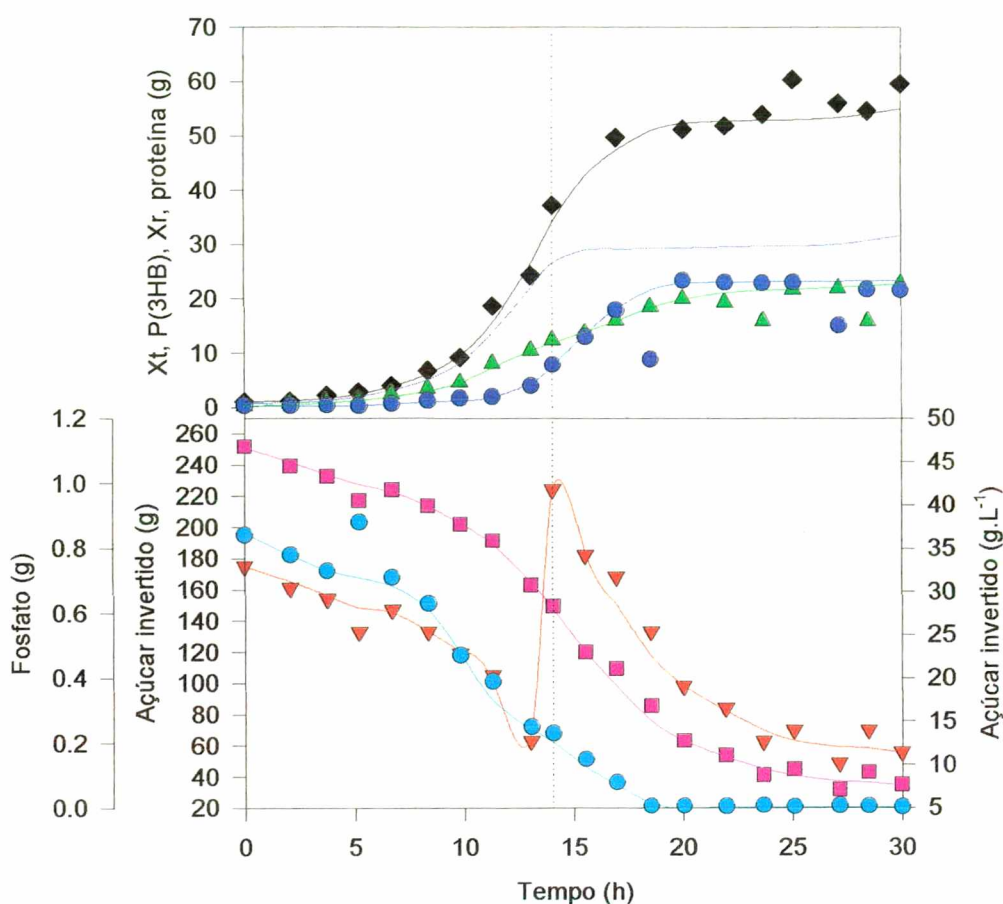


Figura 3.16- Evolução das quantidades de biomassa total (Xt; ◆), P(3HB) (●), biomassa residual (Xr; —), proteína (▲), açúcar invertido (■), fosfato (●) e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) (▼) em função do tempo para a cultura sob carência em fósforo. A linha pontilhada indica a limitação do fósforo.

Pela análise do consumo de fosfato, foi possível determinar a quantidade deste que provoca a limitação do crescimento celular. A **Figura 3.17** apresenta a curva do logaritmo neperiano de biomassa residual e a quantidade residual de fosfato no meio. Observa-se nesta figura que o microrganismo estava com uma velocidade específica máxima de $0,30 \text{ h}^{-1}$ até 14 horas de cultura e também que neste momento a quantidade residual de fosfato no meio era de 0,23 g, correspondente a $0,06 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato. Este resultado está de acordo com Aragão (1996), que observou a diminuição da velocidade

específica de crescimento celular antes do total esgotamento da concentração de fosfato no meio de cultura.

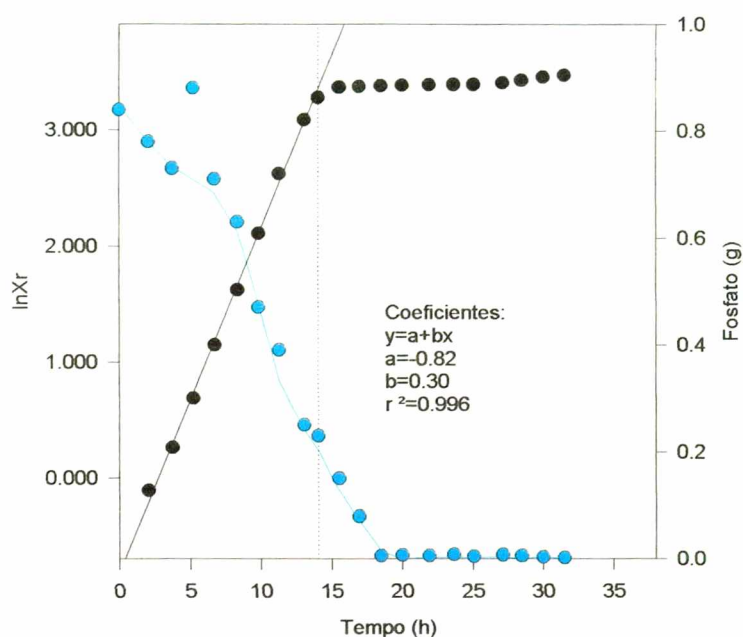


Figura 3.17- Quantidade residual de fosfato no meio (●) e curva do logaritmo neperiano da biomassa residual (●) para a cultura sob carência em fósforo.

A curva da evolução de proteína (**Figura 3.16**) mostra uma atividade protéica mesmo após o esgotamento total de fósforo já que este elemento não interfere diretamente em sua formação. A produção de P(3HB) estabilizou-se, juntamente com a formação de proteína, por volta de 20 horas de cultura. A estabilização da produção de P(3HB) e da formação de proteína pode estar associada à diminuição da atividade metabólica celular.

Uma possibilidade para a manutenção da atividade metabólica celular a níveis que não comprometam a produção de P(3HB), seria a alimentação do elemento limitante durante a fase de produção. Para verificar isto, foi realizada uma cultura sob alimentação controlada de fósforo na fase de produção (cultura D) (**Figura 3.18**). Esta cultura foi baseada nos dados obtidos na cultura C, onde o fator de conversão de fósforo em biomassa residual foi de 104 g.g^{-1} . Este fator de conversão serviu de base para a manutenção do crescimento celular a $0,80 \text{ g.h}^{-1}$, como o estabelecido para a cultura alimentada em nitrogênio. A vazão de fósforo utilizada foi de $0,00769 \text{ g.h}^{-1}$.

Visto que a limitação em fósforo ocorre antes de seu esgotamento, o início da alimentação desta cultura foi estabelecida para uma quantidade de fosfato próximo a 0,25 g, como constatado na cultura C através da **Figura 3.17**. Para a cultura D, a fase de produção e a alimentação iniciou-se em torno de 16 horas de cultura. A **Figura 3.18** mostra que, neste momento, a quantidade residual de fosfato era de 0,34 g, correspondente a $0,09 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato. Nesta fase houve uma produção linear de P(3HB) e proteína, que se estabilizaram por volta de 28 horas. Procurou-se estender este experimento após este tempo, com uma nova alimentação de açúcar invertido, mas foi observado um acúmulo de fosfato que indicava uma diminuição na atividade metabólica celular. Uma provável explicação para o fato seria uma limitação de oxigênio dissolvido no meio.

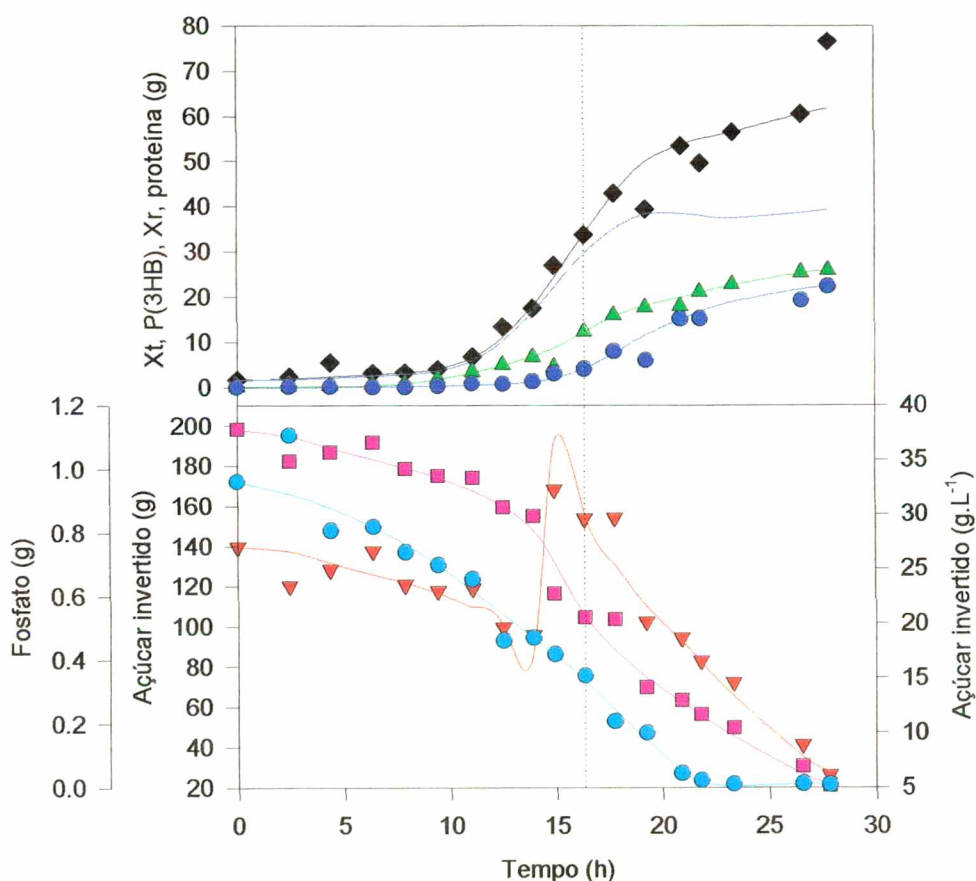


Figura 3.18- Evolução das quantidades de biomassa total (X_t ; ◆), P(3HB) (●), biomassa residual (X_r ; —), proteína (▲), açúcar invertido (■), fosfato (●) e concentração de açúcar invertido (g.L^{-1}) (▼) em função do tempo para a cultura sob limitação em fósforo. A linha pontilhada indica a limitação do fósforo.

A **Figura 3.19** apresenta os resultados de produtividade média para as culturas C e D. Na cultura sob carência em fósforo, obteve-se uma produtividade média máxima de $0,34 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que, para a cultura com alimentação controlada, a produtividade média máxima foi de $0,24 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ao contrário do que se esperava, a produtividade média para a cultura alimentada foi inferior àquela em que não houve alimentação de fósforo. Uma hipótese para este resultado inferior, seria uma alimentação de fósforo além do necessário que provocou uma redução da produção de P(3HB) e favoreceu a produção de biomassa e subprodutos. As produtividades médias obtidas para as culturas C e D foram mais elevadas do que as obtidas sob carência/limitação em nitrogênio. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que a limitação do crescimento por este elemento pode favorecer o crescimento celular residual, com síntese de proteínas.

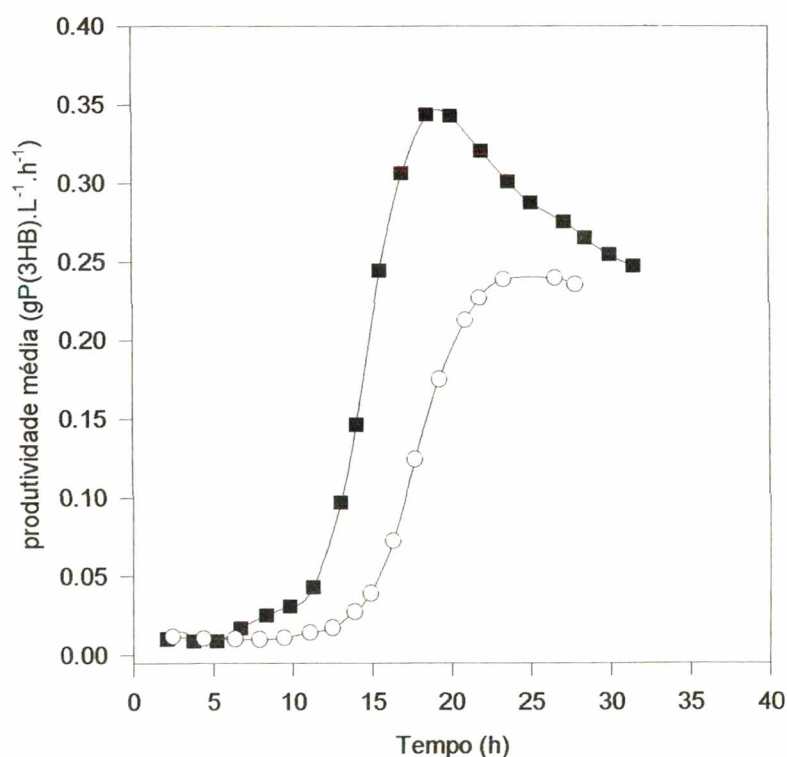


Figura 3.19- Evolução das produtividades médias, expressas em $\text{gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para as culturas sob carência (■) e limitada em fósforo(○).

Comparou-se, então, os resultados de produtividade das quatro culturas calculados durante a fase de produção, eliminando-se assim qualquer influência causada pelo tempo de fase de crescimento (**Figura 3.20**). Nos ensaios usando fósforo como elemento limitante foram alcançados valores de 1,16 e 0,75 gP(3HB).L⁻¹.h⁻¹ para as culturas C e D, respectivamente, enquanto que para as culturas A e B os valores de produtividade na fase de produção foram de 0,59 e 0,43 gP(3HB).L⁻¹.h⁻¹ respectivamente. Isto confirma que o fósforo, por não impedir diretamente a síntese protéica, favorece uma atividade metabólica celular capaz de garantir uma produtividade elevada de P(3HB).

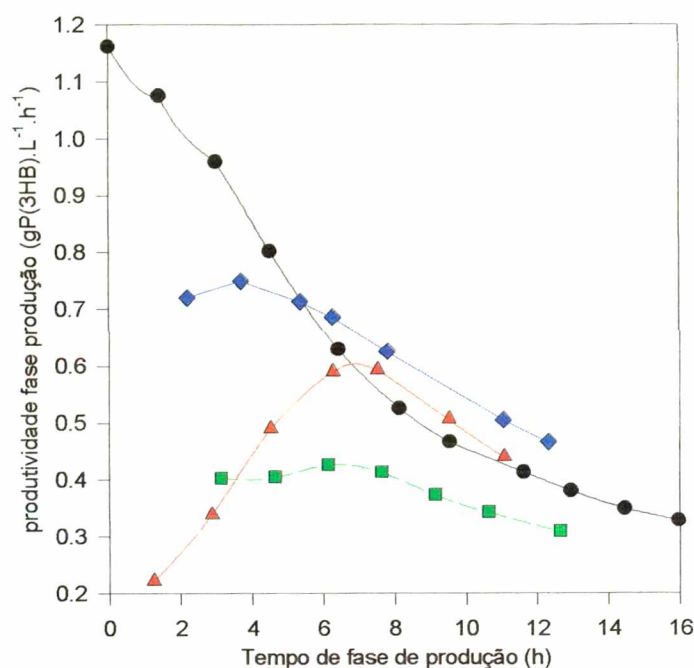


Figura 3.20- Evolução da produtividade em P(3HB) na fase de produção, expressas em gP(3HB).L⁻¹.h⁻¹, para as culturas sob carência em nitrogênio (■), limitação em nitrogênio (▲), carência em fósforo (●) e limitação em fósforo(◆).

As velocidades específicas máximas de crescimento celular foram de 0,30 e 0,31 h⁻¹ respectivamente para as culturas C e D (**Figura 3.21**). Estes valores para a fase de crescimento são bem mais elevados do que aqueles obtidos usando o nitrogênio como elemento limitante. Este fato mostra-se interessante, pois, a obtenção de uma alta produtividade em células tem um efeito favorável sobre o aumento da

produtividade de P(3HB). Uma hipótese para a diferença observada entre as velocidades específicas de crescimento celular nas culturas sob carência/limitação em nitrogênio e sob carência/limitação em fósforo, seria a diferença de composição dos meios de cultura para permitir o esgotamento dos respectivos elementos limitantes.

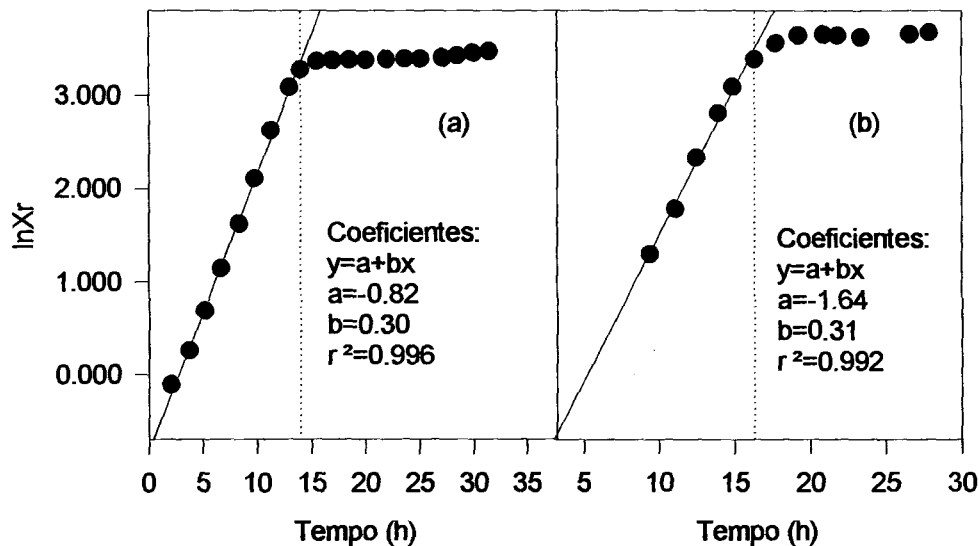


Figura 3.21- Curva do logaritmo neperiano da biomassa residual para a cultura sob carência (a) e limitação (b) em fósforo.

Durante a fase de produção, a velocidade específica máxima de produção de P(3HB) (q_{PHB}) da cultura C foi de $0,14 \text{ h}^{-1}$ e para a cultura D foi de aproximadamente $0,08 \text{ h}^{-1}$ (**Figura 3.22**). Nos dois casos, não se conseguiu manter estes níveis máximos de q_{PHB} por muito tempo, decaindo logo em seguida. A hipótese para esta queda é a mesma que foi feita para a diminuição da velocidade específica de produção de P(3HB) nas culturas usando o nitrogênio como elemento limitante, ou seja, pode ter acontecido uma limitação do oxigênio dissolvido no meio que fez as células se exaurirem.

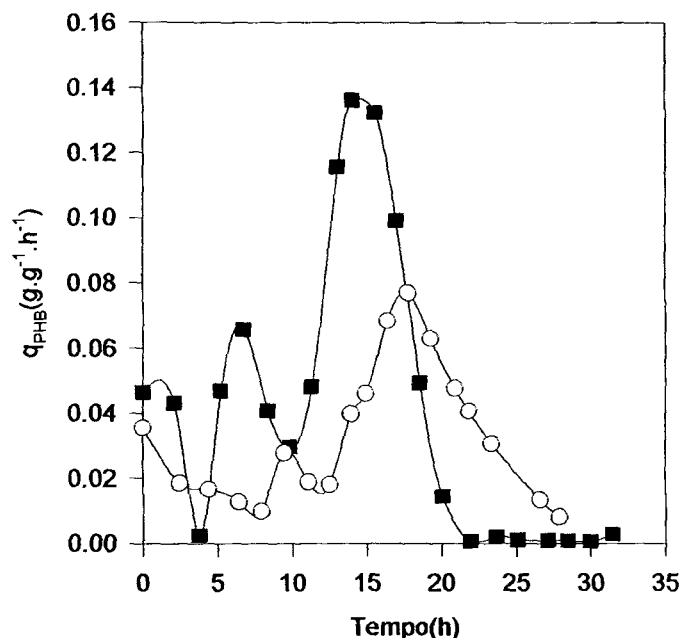


Figura 3.22- Evolução das velocidades específicas de produção de P(3HB) com relação ao tempo para as culturas sob carência (■) e limitação em fósforo (○).

Outro fato que merece ser destacado é que, nos experimentos usando fósforo como elemento limitante, e em particular a cultura com alimentação controlada, o pH variou muito mais do que nos experimentos com nitrogênio o que dificultou bastante o controle do pH da cultura a 7,0 (Figura 3.23).

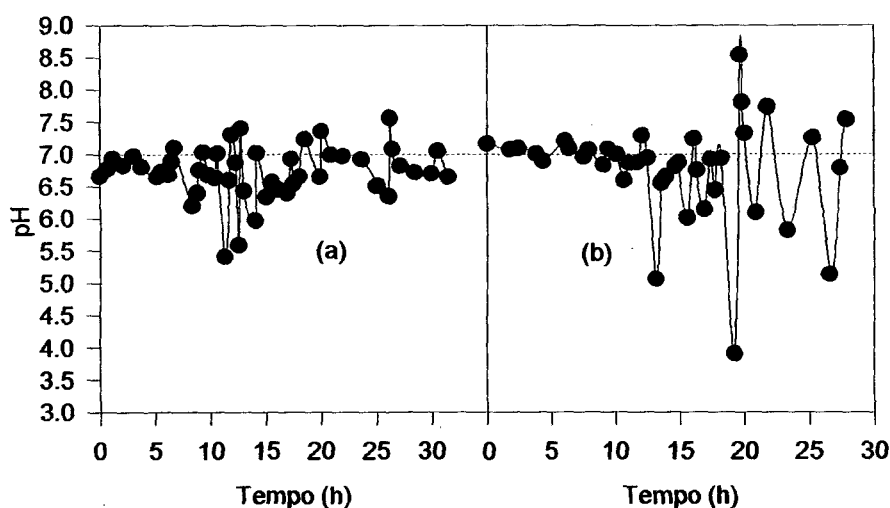


Figura 3.23- Evolução do pH ao longo do tempo para as culturas sob carência (a) e limitação em fósforo (b).

Em todo caso, analisando-se a produtividade e a velocidade específica de P(3HB) das culturas C e D, observa-se que os resultados obtidos para a cultura sob alimentação controlada de fósforo foram inferiores àqueles da cultura sob carência de fósforo. Isto demonstra que é necessário testar novas concentrações de alimentação de fósforo para estudar seu efeito na produção de P(3HB).

3.2.2.2- Conclusão

Nas culturas sob carência e limitação em fósforo não houve interrupção da síntese de proteínas e os valores de produtividade de P(3HB) foram mais elevados do que nas culturas sob carência e limitação em nitrogênio. No entanto, para a cultura limitada em fósforo os resultados de produtividade e velocidade específica de formação de P(3HB) obtidos foram inferiores aos da cultura sob carência em fósforo. Esperava-se que a alimentação controlada de fósforo favorecesse a obtenção de resultados melhores do que sob carência. Acredita-se que, neste caso, houve uma alimentação superestimada de fósforo, produzindo biomassa e/ou subprodutos, diminuindo a produção de P(3HB).

A dificuldade em se controlar o pH e a possibilidade de ter acontecido uma limitação no oxigênio dissolvido podem ter sido os principais fatores para a não manutenção da velocidade específica máxima de produção de PHB (q_{PHB}) nestas culturas, que decresceu logo após ter atingido seu valor máximo.

Os resultados mostram que devem ser feitos mais estudos sob carência/limitação em fósforo para determinar a concentração e a vazão de alimentação de fósforo mais adequados para a produção de P(3HB).

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

4.1- CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a viabilidade de utilização do açúcar invertido como substrato de baixo custo na produção de P(3HB) por *R. eutropha*, bem como, definir estratégias de limitação de crescimento celular durante a fase de produção de polímero que favoreça o acúmulo de P(3HB).

Os estudos desenvolvidos permitiram concluir:

a) Estudos preliminares em frascos agitados:

- Os resultados de velocidades específicas de crescimento celular obtidos em glicose e em açúcar invertido foram bastante similares, o que demonstra que a *R. eutropha* é capaz de se desenvolver em açúcar invertido da mesma forma que em glicose e, portanto é viável o seu uso como substrato alternativo de baixo custo.
- A cultura realizada com ácido láctico, como única fonte de carbono, apresentou valor de velocidade específica de crescimento bem elevado ($0,31 \text{ h}^{-1}$) quando comparado com os valores de velocidades específicas alcançados usando glicose ou açúcar invertido como única fonte de carbono (aproximadamente $0,20 \text{ h}^{-1}$ em ambas). Entretanto, o crescimento do microrganismo neste ácido requer um controle muito mais preciso da concentração de substrato, devido ao efeito inibidor sobre o crescimento do microrganismo para concentrações de ácido láctico maiores que 10 g.L^{-1} (Tanaka et al., 1993).
- É importante que o pH para *R. eutropha* seja mantido em 7,0. Os experimentos em açúcar invertido e em ácido láctico mostraram que valores de pH acima de 7,3 e abaixo de 6,4 apresentavam efeito inibidor sobre o microrganismo, provocando a diminuição na velocidade específica de crescimento celular.

b) Estudo preliminar em biorreator usando açúcar invertido como substrato:

- No experimento em biorreator, obteve-se um fator de conversão de açúcar invertido em biomassa total na fase de crescimento de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$, resultado bastante próximo ao relatado por Kim et al. (1994) usando glicose como substrato que foi de $0,48 \text{ g.g}^{-1}$. Este resultado serviu para comprovar, mais uma vez, a viabilidade do açúcar invertido como fonte alternativa de baixo custo para a produção de P(3HB) por *R. eutropha*.
- A *R. eutropha* sofreu uma limitação da fonte de carbono para valores abaixo de 10 g.L^{-1} de açúcar invertido. Associando este fato aos estudos do IPT (1993), que comprovaram que concentrações de açúcares redutores acima de 40 g.L^{-1} inibiam a *R. eutropha*, concluiu-se que para se evitar a inibição ou limitação do substrato, há a necessidade de se realizar culturas em batelada alimentada de forma a garantir uma concentração de substrato em uma faixa entre 10 e 40 g.L^{-1} .

c) Produção de P(3HB) sob carência e limitação em nitrogênio:

- Foi observado, durante a fase de crescimento não limitado das culturas sob carência/limitação em nitrogênio, que o aumento da massa celular resultou quase totalmente do aumento da biomassa residual. Entretanto, o acúmulo de P(3HB) intracelular iniciou-se antes do esgotamento de nitrogênio no meio, indicando que baixas concentrações de nitrogênio já são limitantes o suficiente para iniciar o processo.
- O valor da produtividade média máxima de P(3HB) obtido para a cultura alimentada em nitrogênio foi superior àquele obtido em carência de nitrogênio. A produtividade média máxima para a cultura sob carência em nitrogênio foi de $0,16 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que para a cultura alimentada em nitrogênio o resultado foi de $0,23 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A velocidade específica máxima de produção de P(3HB) para a cultura alimentada também foi superior ($0,14 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) à velocidade específica obtida para a cultura sob carência ($0,08 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A alimentação controlada de nitrogênio favorece a manutenção

de um crescimento residual com a manutenção de atividade protéica, o que pode levar a obtenção de elevados valores de produtividade e velocidade específica de formação de P(3HB).

- Foi observado, no experimento com alimentação de nitrogênio, que não houve a manutenção da velocidade específica máxima de formação de P(3HB). Este resultado é contrário ao relatado por Aragão (1996) que relacionou a manutenção da velocidade específica de formação de P(3HB) com a alimentação de nitrogênio na fase de produção. Uma hipótese para isto não ter ocorrido seria uma possível limitação no oxigênio dissolvido no meio, que deve ser mantido acima de 20% de saturação, utilizando-se ar.

d) Produção de P(3HB) sob carência e limitação em fósforo:

- Nas culturas sob carência/limitação em fósforo a produção de P(3HB) ocorreu antes do esgotamento deste elemento no meio. Quando o fósforo se esgota no meio, a produção de P(3HB) já se encontra praticamente estabilizada. No caso da carência em fósforo, foi observado o início da produção exponencial de P(3HB) para uma quantidade de fosfato de 0,39 g e a diminuição da velocidade específica de crescimento celular para uma quantidade de fosfato de 0,23 g. Na cultura limitada em fósforo, a alimentação foi feita para uma quantidade residual de fosfato de 0,34 g, valor em que a velocidade específica máxima de crescimento celular começava a decrescer, indicando o início da fase de produção. Com base nestes resultados, nota-se que o momento da alimentação controlada de fósforo, nas condições destes experimentos, deve ser estudado em uma faixa entre 0,39 e 0,23 g de fosfato.
- Os valores de produtividade média e produtividade na fase de produção de P(3HB) foram maiores nas culturas sob carência/limitação em fósforo do que sobre carência/limitação em nitrogênio. Como o fósforo não participa diretamente na síntese de proteína, a carência e a limitação neste elemento não bloqueou a síntese de proteínas, o que pode ter permitido a manutenção de uma atividade metabólica celular mínima com produção de P(3HB).

- A produtividade média máxima de P(3HB) para a cultura com alimentação controlada de fósforo, foi de $0,24 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que para a cultura sob carência de fósforo a produtividade média máxima foi de $0,34 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A produtividade na fase de produção foi para a cultura sob carência em fósforo de $1,16 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e para a cultura limitada em fósforo esta produtividade foi de $0,75 \text{ gP(3HB).L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esperava-se que com uma alimentação controlada de fósforo fosse possível obter uma produtividade de P(3HB) superior àquela obtida sob carência de fósforo, mas isto não ocorreu. Provavelmente a alimentação de fósforo favoreceu a formação excessiva de biomassa e/ou subprodutos, diminuindo a produção de P(3HB).
- A manutenção da atividade protéica não foi condição suficiente para manter por mais tempo a velocidade específica máxima de formação de P(3HB) nas culturas sob carência/limitação em fosfato. Para ambas as culturas, a velocidade específica de formação de P(3HB) decresceu logo após ter atingido o valor máximo. Uma hipótese seria a dificuldade encontrada, nestes experimentos, em se controlar o pH e também a possibilidade de ter ocorrido uma limitação no oxigênio dissolvido no meio.

Como conclusão geral, tem-se que:

- O açúcar invertido demonstrou ser capaz de substituir a glicose como fonte de carbono e, de acordo com os valores de produtividade de P(3HB) obtidos, o desenvolvimento de estratégias de produção de P(3HB) usando fósforo como elemento limitante mostraram ser mais interessantes do que utilizando nitrogênio.

4.2- SUGESTÕES

- Estudo da frutose como única fonte de carbono para avaliação do seu efeito sobre as velocidades específicas de crescimento.
- Estudo do crescimento utilizando-se ácido láctico (puro ou em culturas mistas) com controle de pH para evitar a diminuição da velocidade específica de crescimento.
- Utilização de uma sonda de oxigênio dissolvido que permita determinar com maior precisão o momento da limitação no substrato e também obter melhor controle das condições de aeração e agitação.
- Controlar o pH para manter a cultura nas condições ideais de crescimento e produção de P(3HB).
- Estudo do crescimento de *R. eutropha* em outros substratos de baixo custo, como soro de leite ultrafiltrado.
- Desenvolver novos estudos de produção de P(3HB) em culturas de *R. eutropha* sob carência/limitação em fósforo para determinar a concentração e a vazão de fósforo mais eficazes para a formação deste polímero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. **Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** Microbiol. Rev. 54: 450-472, 1990.
- ARAGÃO, G.M.F. **Production de polyhydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** Toulouse: L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE, 1996. 162p. These (Doctorat spécialité: Biologie et genetique Moleculaires et Cellulaires – Biotechnologie), França, 1996.
- ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; ANDERSON, P.R.; ANDREWS, B.A. **Effect of single nutrient limitation on Poly- β -Hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Bioeng. 46: 497-502, 1995.
- ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. **Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 431-437, 1998.
- BEAR, M.M.; LEBOUCHERDURAND, M.A.; LANGLOIS, V.; LENZ, R.W.; GOODWIN, S.; GUERIN, P. **Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxi groups in the side-chains.** React. Funct. Polymers. 34: 65-77, 1997 apud BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotechnol. 65: 127-161, 1998.
- BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. **Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate.** Appl. Environ. Microbiol. 61: 165-169, 1995.

- BELFARES, L.; PERRIER, M.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; JOLICOER, M.; CHAVARIE, C. **Multi-inhibition kinetic model for the growth of *Alcaligenes eutrophus***. Can. J. Microbiol., 41(suppl. I):143-153, 1995.
- BERGER, E.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. **PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass**. Biotechnol. Tech. 3: 227-232, 1989.
- BITAR, A.; UNDERHILL, S. **Effect of ammonium supplementation on production of Poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture**. Biotechnol. Lett. 12:563-568, 1990.
- BOATMAN, E.S. **Observation on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum***. J. Cell Biol. 20: 297-311, 1964.
- BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Engenharia Bioquímica**. Ed. Edgard Blücher Ltda. Vol. 3, São Paulo, 1975.
- BOURQUE, D.; OUELLETE, B.; ANDRÉ, G.; GROLEAU, D. **Production of poly- β -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens***. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 7-12, 1992.
- BOWEN, B.; SCHLEGEL, H.G. **Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria**. Ann. Rev. Microbiol. 35: 405-452, 1981.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. ***Pseudomonas oleovorans* as a source of poly-(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters**. Appl. Environ. Microbiol. 54 (8):1977-1982, 1988.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. **A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass**. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6:29-37, 1978.

- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; RENNER, G.; ZEISER, A.; HAAGE, G.; LOIDL-LANTHALER, K. **Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization.** Can. J. Microbiol. 41: 239-248, 1995.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.** J. Biotech. 65: 127-161, 1998.
- BRIESE, B.H.; JENDROSSEK, D.; SCHLEGEL, H.G. **Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge.** FEMS Microbiol. Lett. 117: 107-112, 1994.
- BYROM, D. **Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics.** Trends Biotechnol. 5:246-250, 1987.
- BYROM, D. **Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxyvalerate copolymers.** FEMS Microbiol. Rev. 103: 247-250, 1992.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation.** Bioprocess Eng. 17: 335-342, 1997.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 13-21, 1999a.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals.** Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.

- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology**. Sinauer Associates Inc., Science tech, Inc., Madison, Wis. 1984
apud BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. **Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate**. Appl. Environ. Microbiol. 61: 165-169, 1995.
- DANIEL, M.; CHOI, J.H.; KIM, J.H.; LEBEAULT, J.M. **Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas***. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:702-706, 1992.
- DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. **The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms**. Adv. Microbiol. Physiol. 10:135-266, 1973.
- De SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT B.; DAWES E.A. **Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane**. J. Bacteriol. 56: 3354-3359, 1983.
- DOELLE, H.W. **Bacterial Metabolism**. Academiv Press, New York, 1975.
- DOI, Y. **Microbial Polyesters**. VCH Publishers, Inc., New York, 1990.
- DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA, K. **Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids**. Applied Microbiol. Biotechnol. 28: 330-334, 1988.
- DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO T. **Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3—hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)**. Macromolecules, 23: 26-31, 1990b.

- DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KIM, J.H.; LEBEAULT, J.M. **Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus***. FEMS Microbiol. Rev. 103:103-108, 1992.
- DUNLOP, W.F.; ROBARDS, A.W. **Ultrastructural study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus***. J. Bacteriol. 114: 1271-1280, 1973.
- FIDLER, S.; DENNIS, D. **Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli***. FEMS Microbiol. Rev. 103: 231-236, 1992.
- FUKUI, T.; DOI, Y. **Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 333-336, 1998.
- GILMORE, D.F.; ANTOUN, S.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. **Degradation of poly(β -hydroxyalkanoates) and polyolefin blends in a municipal wastewater treatment facility**. J. Environ. Polym. Degrad. 1: 269-274, 1993.
- GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, RCP; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. **Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 785-791, 1996.
- GOMEZ, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. **Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias**. Revista Brasileira de Engenharia Química. 17: 24-29, 1997.
- GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, J.M. **Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium***. Biochem. 7: 3676-3681, 1968.

- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A.J.; CHU L.; DAWES, E.A. **Characterization of two 3-ketothiolases processing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus***. FEMS Microbiol. Lett. 52: 91-96, 1988a.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. **The role of NADH and NADPH linked acetoacetyl-COA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus***. FEMS Microbiol. Lett. 52:91-96, 1988b.
- HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. **The importance of PHB-synthase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus***. FEMS Microbiol. Lett. 57: 1-6, 1989.
- HENDERSON, R.A.; JONES, C.W. **Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus* – purification, characterization and potential regulatory role of citrate synthase**. Arch. Microbiol. 168: 486-492, 1997 apud BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects**. J. Biotechnol. 65: 127-161, 1998.
- HOLMES, P.A.; WRIGHT, L.F.; ALDERSON, B.; SENIOR, P.J. **A process for the extraction of poly-3-hydroxybutyric acid from microbial cells**. European Patent No. 15 123, 1980.
- HOLMES, P.A. **Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic**. Phys. Technol. 16: 32-36, 1985.
- HUISMAN, G.W.; LEEUW, O.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. **Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads**. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1949-1954, 1989.

- INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS-IPT. **Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar por via biotecnológica.** Relatório No 31478/93, volume II. 1993, 103p.
- KANG, C.K.; KUSAKA, S.; DOI, Y. **Structure and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Lett. 17: 583-588, 1995.
- KIM, B.H. **Physiology in Microorganisms.** Academy Books, Seoul, 1988 apud SEO, J.K.; YOON, J.Y.; OH J.T.; KIM W.S. **Optimum growth conditions and pH control solution for PHB biosynthesis in *A. eutrophus*.** J. Ind. Eng. Chem. 4 (3): 215-220, 1998.
- KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K.; WOO, S.I. **Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control.** Biotechnol. Bioeng. 43: 892-898, 1994.
- KIM, B.S.; CHANG, H.N. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*.** Biotechnol. Lett. 20 (2): 109-112, 1998.
- KIM, S.W.; KIM, P.; LEE, H.S.; KIM, J.H. **High production of poly- β -hydroxybutyrate under potassium limitation.** Biotechnol. Lett. 18 (1): 25-30, 1996.
- KUNIOKA, M.; KAWAGUSHI, Y. ; DOI, Y. **Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 569-573, 1989.
- LEE, S.Y. **Suppression of filamentation in recombinant *E. coli* by amplified *ftsZ* activity.** Biotechnol. Lett. 16: 1247-1252, 1994.
- LEE, S.Y. **Plastic bacteria – progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.** Trends Biotechnol. 14: 431-438, 1996a.

- LEE, S.Y. **Bacterial polyhydroxyalkanoate**. Biotechnol. Bioeng. 49:1-14, 1996b.
- LEE, S.Y. **High cell density cultivation of *Escherichia coli***. Trends Biotechnol. 14: 90-105, 1996c.
- LEE, S.Y. ***E. coli* moves into the plastic age**. Nat. Biotechnol 15: 17-18, 1997.
- LEE, S.Y. **Poly(3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli***. Bioprocess Eng. In press. 1998 apud CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hidroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals**. Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.
- LEE, S.Y.; CHANG, H.N. **High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source**. Biotechnol. Lett. 15: 971-974, 1993 apud CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hidroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals**. Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.
- LEE, S.Y.; CHANG, H.N. **Production of poly(hydroxyalkanoic acid)**. Adv. in Biochem. Eng./Biotechnol. 52: 27-58, 1995.
- LEE, S.Y.; LEE, K.M.; CHANG, H.N.; STEINBUCHER, A. **Comparison of *Escherichia coli* strains for the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes**. Biotechnol. Bioeng. 44: 1337-1347, 1994.
- LEE, I.Y.; KIM, M.K.; PARK, Y.H.; LEE, S.Y. **Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme-activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli***. Biotechnol. Bioeng. 52: 707-712, 1996.

- LEE, S.Y.; MIDDELBERG, A.P.J.; LEE, Y.K. **Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli***. *Biotechnol. Lett.* 19: 1033-1035, 1997 **apud** CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hidroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals**. *Biotechnol. Bioeng.* 62(5): 546-553, 1999b.
- LEE, S.Y.; CHOI, J. **Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus***. *Polym. Degrad. Stabil.* 59: 387-393, 1998.
- LIU F.; LI, W.; RIDGWAY, D.; GU, T. **Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli***. *Biotechnol. Lett.* 20 (4): 345-348, 1998.
- LUNDGREN, D.G.; PFISTER, R.M.; MERRICK, J.M. **Structure of poly- β -hydroxybutyric acid granules**. *J. Gen. Microbiol.* 34: 441-446, 1964.
- LUZIER, W.D. **Materials derived from biomass biodegradable materials**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 839-842, 1992.
- MACRAE, R.M.; WILKINSON, J.F. **Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium***. *J. Gen. Microbiol.* 19: 210-222, 1958 **apud** BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects**. *J. Biotechnol.* 65: 127-161, 1998.
- MILLER, G.L. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428, 1959.
- MORINAGA, Y.; YAMANAKA, S.; ISHIZAKI, A. **Growth characteristics and cell composition of *Alcaligenes eutrophus* in chemostat culture**. *Agric. Biol. Chem.* 42(2): 439-444, 1978.

- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. **Química Orgânica**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.
- NAKAMURA, S.; KUNIOKA, M.; DOI, Y. **Biosynthesis and characterization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate)**. *Macromol. Rep. A* 28: 15-24, 1991.
- NAKAMURA, S.; DOI, Y.; SCANDOLA, M. **Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)**. *Macromolecules* 25: 4237-4241, 1992.
- NISHIDA, H.; TOKIWA, Y. **Effects of higher-order structure of poly(3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation**. *J. Environ. Polym. Degrad.* 1: 65-80, 1993.
- NUTI, M.P.; de BERTOLDI, M.; LEPIDI, A.A. **Influence of phenylacetic acid on poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum***. *Can. J. Microbiol.* 18: 1257-1261, 1972.
- OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G. **β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism**. *Biochem. J.* 134: 239-248, 1973.
- PADGETTE, R.S.; MITSKY, T.A.; GRUYS, K.J.; TRAN, M.; TAYLOR, N.B.; SHAH, D.T.; SLATER, S.C.; COLBURN, S.M.; KISHORE, G.M. **Strategies for PHA production in plants vs microorganisms**. *International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Davos – Switzerland, 1996.
- PAGE, W.J.; KNOSP, O. **Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azobacter vinelandii* UWD**. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6):1334-1339, 1989.

- PAGE, W.J.; MANCHAK, J.; RUDY, B. **Formation of poly(-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD.** Appl. Environ. Microbiol. 58: 2866-2873, 1992.
- PAGE W.J.; CORNISH H.A. **Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extration of poly- β -hydroxybutyrate.** Appl. Environ. Microbiol. 59:4236-4244, 1993.
- PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. **Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetyl-CoA recdutase.** J. Biol. Chem. 264: 15293-15297, 1989a.
- PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. **Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC).** J. Biol. Chem. 264: 15298-15303, 1989b.
- PEPPLER, H.J. **Production of yeasts and yeast products,** p.157 in H.J. PEPPLER; D. PERLMAN (ed.), Microbial Technology, vol1. Academic Press, Inc., Orlando, Fla, 1979 **apud** BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. **Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate.** Appl. Environ. Microbiol. 61: 165-169, 1995.
- POIRIER, Y.; DENNIS, D.E.; KLOMPARENS, K.; SOMEVILLE, C. **Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants.** Science 256: 520-523, 1992.
- POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE C. **Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants.** Biotechnology 13:142-150, 1995.

- PREUSTING H.; KINGMA J.; WITHOLT B., **Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures.** *Enz. Microbiol. Technol.*, 13:770-780, 1991.
- RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE C.; DUBÉ B.; BATAILLE P., RAMSAY J.A. **Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids.** *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2093-2098, 1990a.
- RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; RAMSAY B.A.; CHAVARIE, C. **Recovery of poly- β -hydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment.** *Biotechnol. Tech.* 4: 221-226, 1990b.
- RAMSAY, B.A.; SARACOVAN, I.; RAMSAY, J.A.; MARCHESSAULT, R.H.; **Continuous production of long-side-chain poly- β -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2):744-746, 1991.
- RAMSAY, B.A. **Physiological factors affecting PHA production.** In: *Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (proceedings)*, p.9-17, 1994a.
- RAMSAY, J.A. **PHA: Its separation from microbial biomass and its biodegradation.** In: *Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (proceedings)*, p. 49-58, 1994b.
- REPASKE, R.; REPASKE, A.C. **Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (4): 585-591, 1976.
- REPASKE, R. **Nutritional requirements for *Hydrogenomonas eutropha*.** *J. Bacteriol.* 83: 418-422, 1962 apud BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. **Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate.** *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 165-169, 1995.

- REUTZ, I.; SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. **Effect of phosphoglycerate mutase deficiency metabolism of *Alcaligenes eutrophus***. J. Bacteriol. 151: 8-14, 1982.
- RYU, H.W.; HAHN, S.K.; CHANG, Y.K.; CHANG, H.N. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation**. Biotechnol. Bioeng. 55: 28-32, 1997.
- SCHLEGEL, H.G.; GOTTSCHALK, G.; VON BARTHA, R. **Formation and utilisation of poly- β -hydroxybutyric acid by *knallgas* bacteria (*Hydrogenomonas*)**. Nature 191: 463-465, 1961.
- SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. **Unusual C3 and C4 metabolism in the chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus***. J. Bacteriol. 159 (1): 162-172, 1984.
- SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHELEGEL, H.Y. **Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli***. J. of Bacteriol. 170: 5837-5847, 1988.
- SCHUBERT, P.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. **Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: Identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter**. J. Bacteriol. 173(1):168-175, 1991.
- SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. **Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii***. Biochem. J., 125: 55-66, 1971.
- SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. **The regulation of poly-B-hydroxybutyrate metabolism in *Azobacter beijerinckii***. Biochem. J. 134: 225-238, 1973.

- SEO, J.K.; YOON, J.Y.; OH J.T.; KIM W.S. **Optimum growth conditions and pH control solution for PHB biosynthesis in *A. eutrophus***. J. Ind. Eng. Chem. 4 (3): 215-220, 1998.
- SIM, S.J.; SNELL, K.D.; HOGAN, S.A.; STUBBE, J.; RHA, C.K.; SINSKEY, A.J. **PHA synthase activity controls the molecular-weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo**. Nat. Biotechnol. 15: 63-67, 1997.
- SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D.E. **Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -droxybutyrate biosynthetic pathway**. J. Bacteriol. 170: 4431-4436, 1988.
- SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R.M. **Formal kinetics of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplana rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium limited batch cultures**. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7: 1-10, 1979.
- STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. **Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus* wich are impaired in the accumulation of poly(β -hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 168-175, 1989.
- STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. **Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acids) synthesis in *Alcaligenes eutrophus***. Mol. Microbiol. 5(3): 535-542, 1991.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. **Diversity of bacterial poly-hydroxyalkanoic acid**. FEMS Microbiol. Lett. 128: 219-228, 1995.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. **Bacterial and other biological systems for polyester production**. Trends Biotechnol. 16: 419-427, 1998.

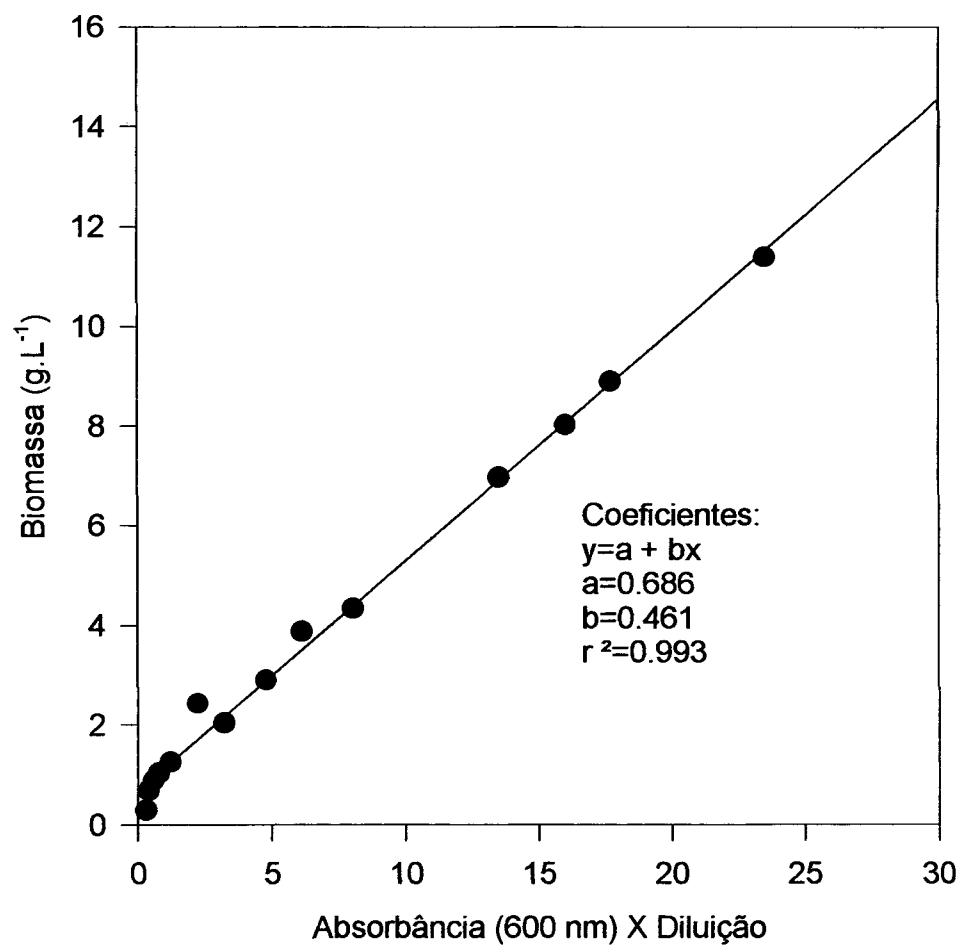
- STICKLAND, L.H. **The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction.** J. Gen. Microbiol. 5: 689-703, 1951.
- SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU S. **Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:366-369, 1986.
- TANAKA, K.; KATAMUNE K.; ISHIZAKI, A. **Fermentative production of poly- β -hydroxybutyric acid from xylose by two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Lett. 15 (12): 1217-1222, 1993.
- TANAKA, K.; ISHIZAKI, A.; KANAMARU, T.; KAWANO, T. **Production of poly-(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂ and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Bioeng. 45: 268-275, 1994.
- TIM A.; STEINBÜCHEL A. **Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*.** Appl. Environ. Microbiol. 56 (11): 3360-3367, 1990.
- VALENTIN, H.E.; SCHÖNEBAUM, A.; STEINBÜCHEL, A. **Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoates acids from bacteria.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 507-514, 1992.
- WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. **Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge.** Environ. Sci. Technol. 8: 576-579, 1974.
- WANG, W.S.; LUNDGREN, D.G. **Poly- β -hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*.** J. Bacteriol. 97: 947-950, 1969.

- WANG, F.; LEE, S.Y. **Poly (3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation.** Appl. Environ. Microbiol. 63: 3703-3706, 1997a.
- WANG, F.; LEE, S.Y. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*.** Appl. Environ. Microbiol. 63: 4765-4769, 1997b.
- WANG, F.; LEE, S.Y. **High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium.** Biotechnol. Bioeng. 58 (2-3): 325-328, 1998.
- WEGEN, R.J. van; LING, Y.; MIDDELBERG, A.P.J. **Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis.** Trans IchemE. 76: 417-426, 1998 apud CHOI, J.; LEE, S.Y. **Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 13-21, 1999.
- WONG, H.H.; LEE, S.Y. **Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 30-33, 1998.
- YAMANE, T. **Cultivation engineering of microbial bioplastics production.** FEMS Microbiol. Rev. 103:257-264, 1992.
- YAMANE, T. **Yield of poly-(D)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study.** Biotechnol. Bioeng. 41:165-170, 1993.
- YAMANE, T.; FUKUNAGE, M.; LEE, Y.W. **Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer.** Biotechnol. Bioeng. 50: 197-202, 1996.

- ZHANG, H.; OBIAS, V.; GONYER, K.; DENNIS, D. **Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains.** Appl. Environ. Microbiol. 60: 1198-1205, 1994 apud
- CHOI, J.; LEE, S.Y. **Efficient and economical recovery of poly(3-hidroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals.** Biotechnol. Bioeng. 62(5): 546-553, 1999b.

ANEXOS

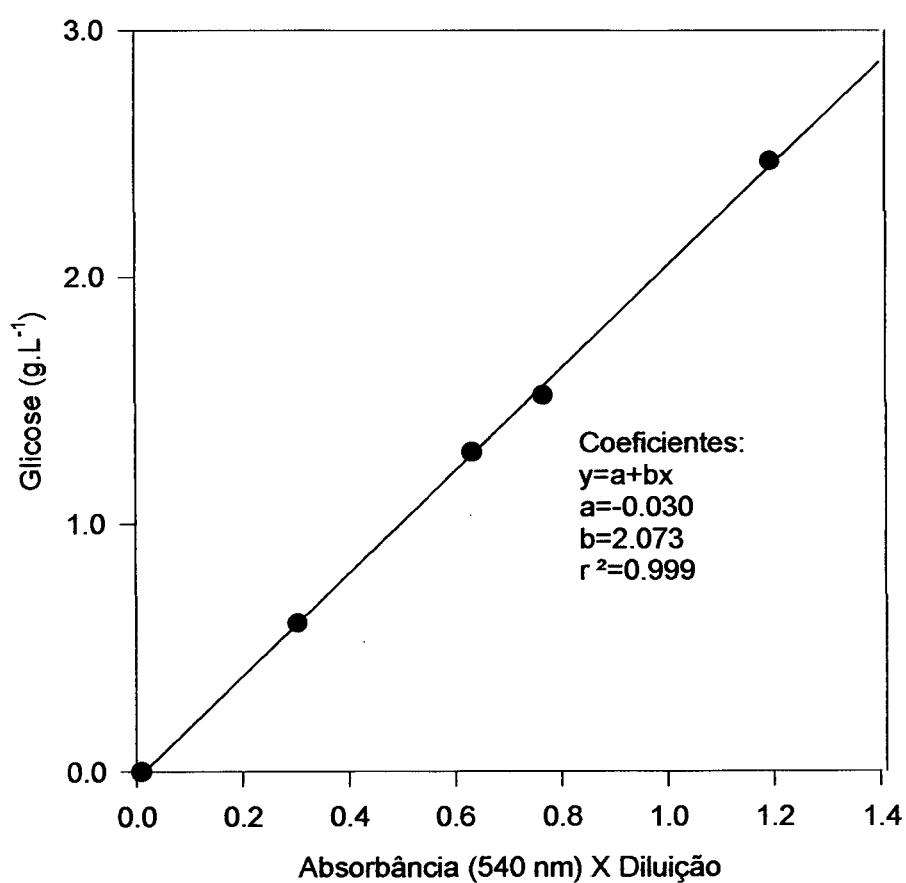
ANEXO1

Curva de calibração para *Ralstonia eutropha*.

ANEXO 2

Curva de calibração de determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS).

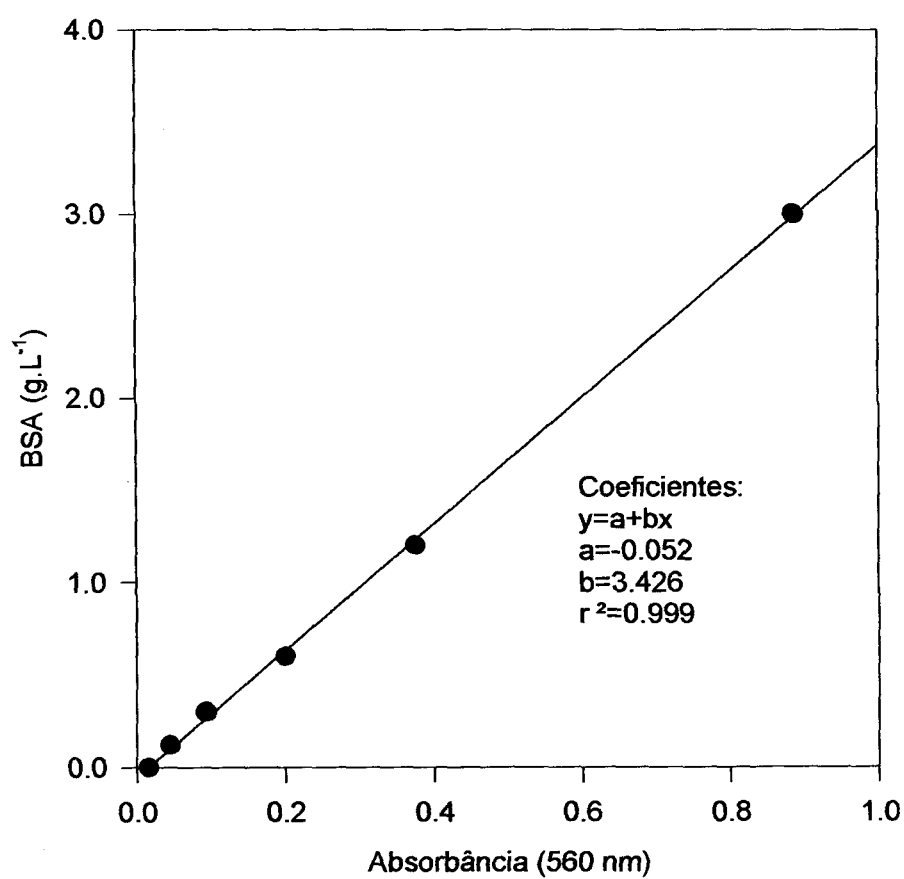
Curva de calibração: padrão glicose



ANEXO 3

Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto.

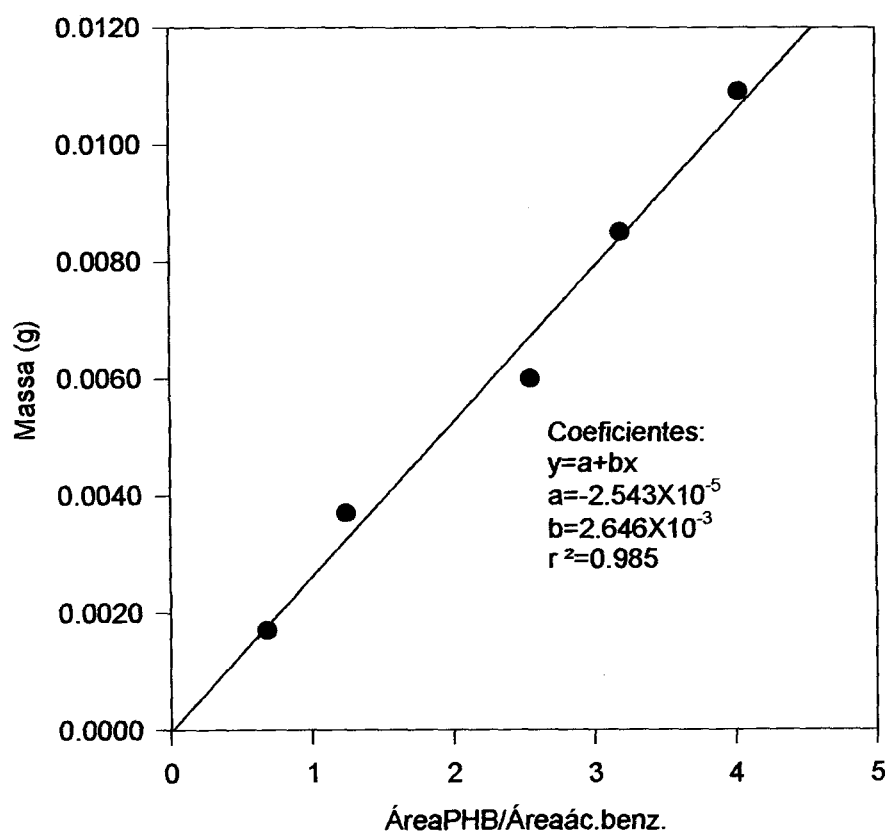
Curva de calibração: padrão albumina bovina (BSA)



ANEXO 4

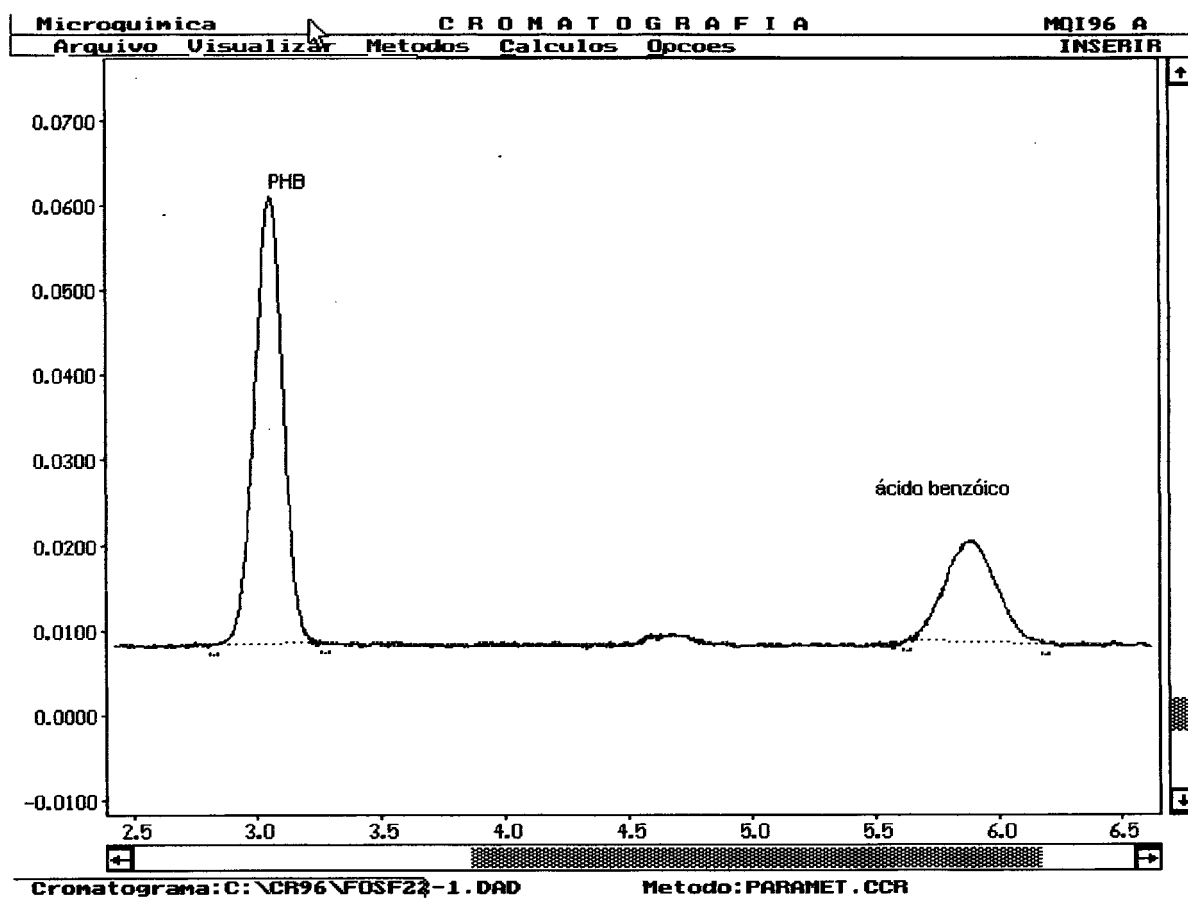
Curva de calibração do poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)).

Curva de calibração: padrão poli-3-hidroxibutirato
padrão interno ácido benzóico



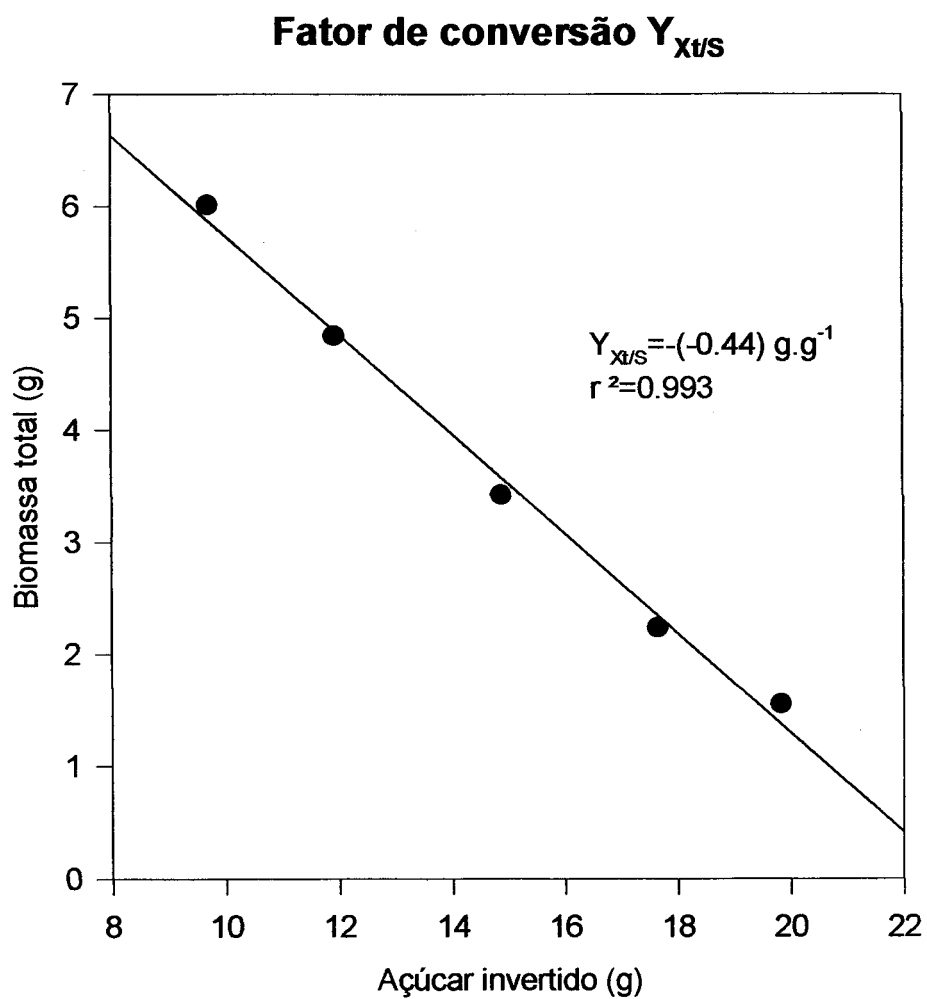
ANEXO 5

Apresentação de um cromatograma típico de análise de poli- β -hidroxibutirato.



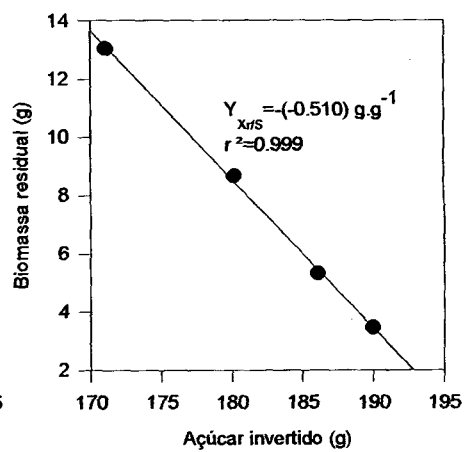
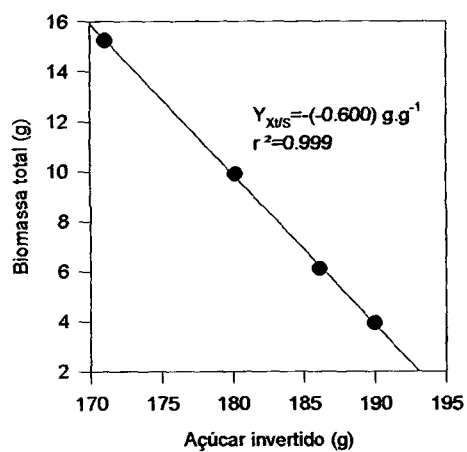
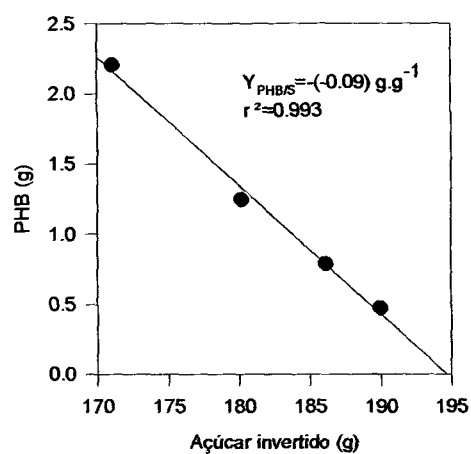
ANEXO 6

**Fator de conversão açúcar invertido em biomassa total na fase de crescimento
(análise preliminar).**



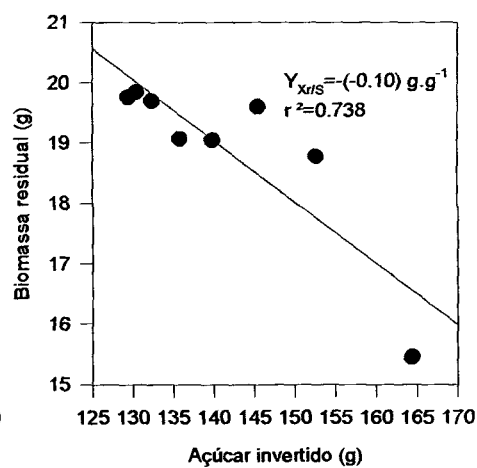
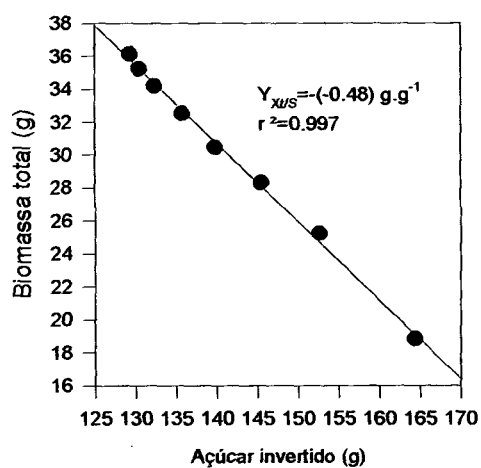
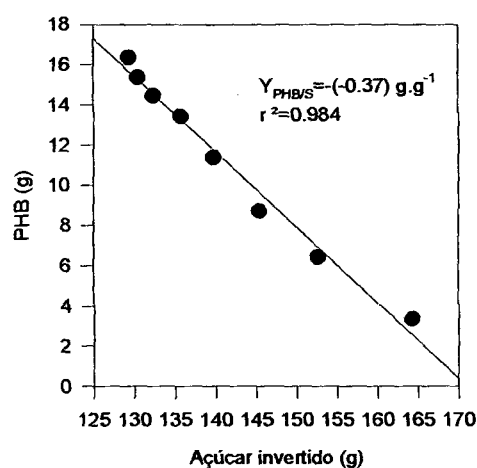
ANEXO 7

Fatores de conversão substrato em biomassa total, biomassa residual e P(3HB) para a cultura sob carência em nitrogênio durante a fase de crescimento.



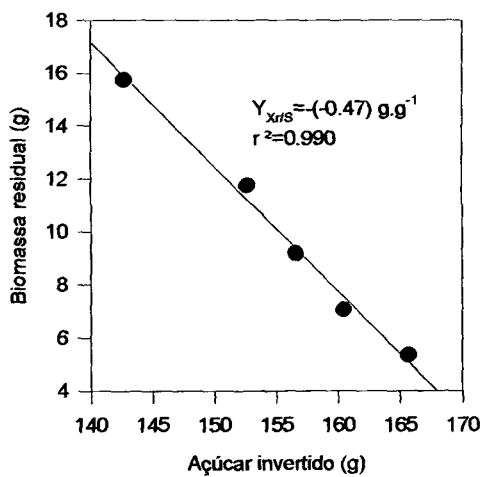
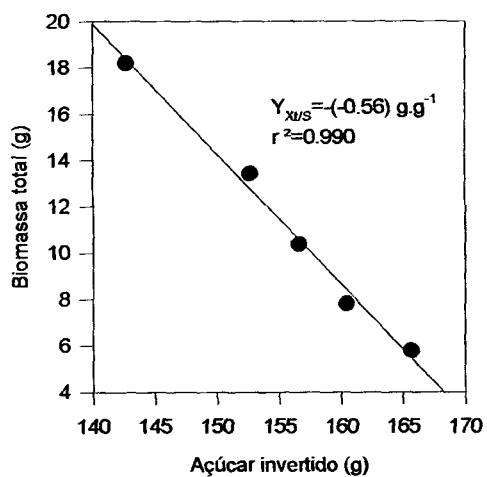
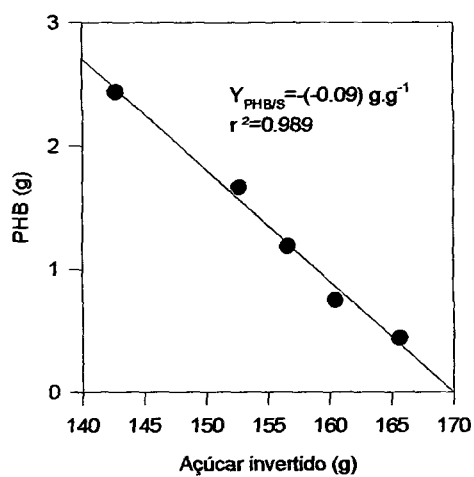
ANEXO 8

Fatores de conversão substrato em biomassa total, biomassa residual e P(3HB) para a cultura sob carência em nitrogênio durante a fase de produção.



ANEXO 9

Fatores de conversão substrato em biomassa total, biomassa residual e P(3HB) para a cultura sob limitação em nitrogênio durante a fase de crescimento.



ANEXO 10

Fatores de conversão substrato em biomassa total, biomassa residual e PHB para a cultura sob limitação em nitrogênio durante a fase de produção.

